Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Albuminstoffwechsel bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jorge Casals Stenzel
aus Madrid

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0063

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Der Einfluß von Phenobarbital auf den Albuminstoffwechsel bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jorge Casals Stenzel
aus Madrid

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. K. Mörike

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Remmer

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. H. Bennhold

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
Einleitung und Fragestellung	1
Material und Methoden	4
Ergebnisse	14
Interpretation und Diskussion	34
Zusammenfassung	43
Tabellen	44
Literaturverzeichnis	58

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Es ist allgemein bekannt, daß an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Zellen die Eiweißsynthese stattfindet (10, 36, 66). Auch die Albuminsynthese erfolgt an diesen Strukturen in den Leberzellen, wie öfters vertreten wurde (12 bis 14) und wie Takagi und Ogata (90) endgültig beweisen konnten.

Das Albumin hat wichtige Funktionen in physiologischer und pharmakologischer Hinsicht. Auf die osmotische und Transportfunktion (8, 71) sei nur hingewiesen. Von physiologischer Bedeutung ist der Transport von Ionen, Bilirubin, Harnsäure, freiem Acetylcholin, Fettsäuren u.a.. Auch pharmakologisch wirksamen Substanzen wie Barbituraten, Penicillin, Sulfonamiden u.a. (4, 6, 21, 33, 34, 71) dient Albumin als Vehikel. Diese ausgeprägte Transportfunktion im Blut kommt dadurch zustande, daß besonders die Albuminfraktion alle aufgezählten Substanzen leicht bindet.

Nach Verabreichung verschiedener Pharmaka, darunter Phenobarbital, fand Remmer (74) eine Steigerung der Aktivität arzneimittelabbauender Enzyme, die ebenfalls an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen verankert sind (75, 76, 78). Nach mehrmaliger Phenobarbitalgabe ließen sich an Hand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Leberschnitten Veränderungen in der Leberzelle feststellen. Die ribosomenfreien ("smooth") Membranen waren stark vermehrt und die restlichen Zellstrukturen, wie Kern, Mitochondrien und ribosomenhaltige ("rough") Membranen unverändert geblieben. Außerdem konnte man biochemisch feststellen (79), daß in den ribosomenfreien, nicht aber in den ribosomenhaltigen Membranen, der Lipoid- und Proteingehalt um das Zwei- bis Dreifache angestiegen war.

Weitere Versuche in vitro (29, 40, 94) und teilweise in vivo (31, 45, 87) ergaben, daß nach Phenobarbitalgabe die Proteinsynthese zahlreicher Enzyme, die im endoplasmatischen Retikulum vorliegen, ansteigt. Dabei kommt es im Lauf der Behand-

lung zu einer Vermehrung des gesamten Proteingehalts der Zelle (5, 23, 28). Die Leber hypertrophiert.

Hier stellt sich nun folgende Frage: Handelt es sich um eine Proteinvermehrung, an der alle Enzyme gleichmäßig beteiligt sind? Am besten ist der Anstieg derjenigen Enzyme des endoplasmatischen Retikulums bekannt, die mit dem Arzneimittelabbau zusammenhängen. Ihr Anteil an den Proteinen der endoplasmatischen Membranen ist sehr hoch. Man schätzt ihn auf 20 bis 50 %.

Der Anstieg dieser Enzyme ist auf eine typische Induktion der Synthese zurückzuführen. Auch das Albumin wird an den gebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und erscheint dann wie die arzneimittelabbauenden Enzyme als Bestandteil dieser Membranen (90), von denen es dann auf noch ungeklärte Weise in das Blut abgegeben wird. Es ist dabei zu vermuten, daß auch die Albuminsynthese wie diejenige der arzneimittelabbauenden Enzyme induziert wird. Bisher wurde aber diese Frage weder gestellt noch experimentell geprüft. Eine Prüfung gerade der Albuminsynthese vor und nach Phenobarbitalbehandlung bot sich auch deshalb an, weil das Albumin in größeren Mengen in der Leber vorliegt und seine Isolierung in nahezu reiner Form möglich ist. Außerdem wurde sein Stoffwechsel schon von vielen Autoren beschrieben (12, 17, 42, 46, 48, 68, 73). Aber bisher wurde noch nicht geprüft, wie sich seine In-vivo-Synthese nach Gabe eines Pharmakons, das die arzneimittelabbauenden Enzyme induziert, verhält.

Um die gestellte Frage zu beantworten, schien es angezeigt, den Umsatz des Albumins in der Leber wie auch im Plasma zu bestimmen. Nach Injektion markierter Aminosäuren wird die Änderung der spezifischen Aktivität des Albumins in den Lebermikrosomen und im Blutplasma unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen. Es lag auch nahe, ein bereits gut untersuchtes und enzyminduzierendes Arzneimittel zu verwenden, das auch schon von den oben genannten Autoren gebraucht worden ist: Phenobarbital.

Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß tatsächlich die Albuminsynthese während einer Phenobarbitalbehandlung ansteigt. Weiterhin liefert sie interessante neue Einblicke in die Dynamik der Albuminsynthese und -abgabe aus der Leber. In der kurzen Zeit von ungefähr vier bis sechs Stunden ist ein Gleichgewicht zwischen synthetisiertem Albumin in der Leber und zirkulierendem Albumin im Blut erreicht.

MATERIAL UND METHODEN

1) Tiere, Tierhaltung, Substanzen und Scintillationsmethode

Es wurden männliche Wistarratten, die vom Versuchstierhändler geliefert wurden, verwendet. Das Körpergewicht lag im allgemeinen, wenn nicht anders angegeben, zwischen 100 und 110 Gramm. In vereinzelten Versuchen schwankte es zwischen 110 und 140 Gramm.

Die Fütterung bestand aus dem Standardfutter "Altromin" der Firma Altroge und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde nicht vor den Versuchen abgesetzt.

Vorbehandlung der Tiere: Phenobarbital wurde in Form von Phenobarbital-Natrium (Merck 50 018) als 4 %ige wäßrige Lösung in Dosen von 80 mg/kg Körpergewicht und Tag intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten statt dessen 0,9 %ige NaCl-Lösung intraperitoneal in gleicher Menge.

Die radioaktiv markierten Aminosäuren wurden in Form eines ^{14}C-markierten Algenprotein-Hydrolysates (Schwarz Bio Research, Inc.) verdünnt mit einer Lösung, die aus 8 Teilen 0,9 %iger NaCl-Lösung und 2 Teilen Tris-Puffer, pH 7,5, bestand. Sie wurden in Dosen von 5 und 10 µCi intravenös oder intraperitoneal verabreicht. Zur intravenösen Injektion wurde der Schwanz eine Minute lang in warmem Wasser (40 bis 43° C) erwärmt und eine Schwanzvene punktiert.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tri-Carb Liquid Scintillations Counter der Firma Pakkard Instruments. Es wurden vier Messungen von jeder Probe durchgeführt. Bei gut mischbaren Lösungen wurde eine Dioxan-Naphthalin-Scintillationsflüssigkeit (0,5 ml der Probelösung und 10 ml Scintillationsflüssigkeit) verwendet, bei schlecht mischbaren Lösungen Filterpapierplättchen (für 0,1 ml, Firma Schleicher und Schüll, Nr. 598, Ø 2,5 cm), die im Trockenschrank fünf Minuten getrocknet und mit fünf Milliliter Toluolscintillationsflüssigkeit zur Messung gegeben wurden.

2) Entnahme und Aufarbeitung des Materials

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert, was die Ergebnisse nicht beeinflußt (15).

Danach wurde das Abdomen bis zum Sternum geöffnet, die Leber caudal weggeschoben, das Diaphragma transversal aufgeschnitten und somit das Herz freigelegt. Die Herzpunktion wurde mit einer Kanüle Nr. 1 durchgeführt und mit einer heparinisierten (Liquemin "Roche") Spritze durch Aufziehen Blut bis zur Entblutung der Ratte entnommen.

Danach wurde die Leber schnell herauspräpariert und in eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung bis zur Weiterverarbeitung belassen.

Um einer Hämolyse zu entgehen, wurde das Blut nach Abkühlung 10 Minuten bei 1 000 Upm und danach 10 Minuten bei 2 500 Upm zentrifugiert. Das Plasma wurde von den Erythrozyten getrennt.

Mikrosomenpräparation aus der Leber (77): Die Leber wurde gewogen, mit der Schere zerkleinert und in einem 6,5fachen Volumen 0,25 m Saccharose-Lösung, die 1 ml EDTA (Titriplex III, Merck 8418) enthielt, in einem Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert. Nach Abzentrifugieren (in der Kühlzentrifuge bei + 3°C) der Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien bei 500, 7 500 und 10 500 Upm jeweils 10 Minuten lang wurde der verbleibende Überstand 60 Minuten bei 40 000 Upm (105 000 g) im Rotor 50 der Spinco-Zentrifuge zentrifugiert und die sedimentierten Mikrosomen in 0,15 m KCl-Lösung suspendiert (gewaschen, um sicher zu sein, daß kein Albumin vom Zellsaft an den Mikrosomen hängen geblieben war) und nochmals bei 105 000 g eine Stunde zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen.

3) Bestimmung des Gesamtproteins und Albumins im Blutplasma

Nach Debro und Mitarbeitern (26)

Je nach vorhandener Plasmamenge wurde die Mikro-, bzw. Makromethode verwendet.

I) Gesamtproteinbestimmung

a) Makromethode

0,5 ml Plasma
9,5 ml dest. H_2O
gut mischen
Proteinbestimmung nach Lowry aus 10 µl der Probe

b) Mikromethode

10 µl in ungefähr 100 µl dest. H_2O pipettieren, auffüllen mit dest. H_2O auf 10 ml
Proteinbestimmung nach Lowry aus 1 ml der Probe

II) Albuminbestimmung

a) Makromethode

0,5 ml Plasma
9,5 ml alkoholische TCE
gut mischen durch Umschwenken
Abzentrifugieren der Globuline
Albuminbestimmung nach Lowry aus 10 µl des Überstandes

b) Mikromethode

10 µl Plasma mit ungefähr 100 µl dest. H_2O verdünnen
mit 200 µl 15 %iger TCE präzipitieren
mit 96 %igem Äthanol auf 1 ml auffüllen
gut schütteln
Abzentrifugieren der Globuline
Albuminbestimmung nach Lowry aus 100 µl des Überstandes

III) Farbreaktion

Nach Lowry und Mitarbeitern (55)
Proben auf 2 ml mit dest. H_2O verdünnen
5 ml Cu-Carbonat-Reagenz zugeben
gut mischen
10 Minuten stehen lassen
0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, 1 n, schnell zugeben
mischen
nach 30 Minuten bei 780 nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gegen Reagenzien-Leerwert ablesen
Protein-, bzw. Albumingehalt in Gamma pro Ansatz nach Eichkurve berechnet.

IV) Lösungen

1 % TCE in 96 % Äthanol (Merck 807)
96 %iges Äthanol aus Äthanol absolut (Merck 807)
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck 9001) mit dest. H_2O 1:1 verdünnen
Cu-Carbonat-Reagenz:
I. 2 % Na_2CO_3 (Merck 6392) in 0,1 n NaOH
II. 1 % Na-K-Tartrat (Merck 8087) und 0,5 % $CuSO_4 . 5\ H_2O$ (Merck 2790) 1:1 gemischt
50 ml Lösung I und 1 ml Lösung II täglich frisch herstellen

Die Protein- und Albuminbestimmung im Serum wurden auch deswegen durchgeführt, weil die Isolierung dieser Proteine nicht quantitativ ist.

4) Bestimmung der spezifischen Aktivität des mikrosomalen Proteins

Nach Mans und Novelli (58)

a) Aktivitätsbestimmung

0,1 ml Mikrosomensuspension auf Filterpapierplättchen auftragen

30 Sekunden in warmer Luft trocknen lassen
Filterplättchen in 10 %ige TCE eintauchen
mindestens 3 Stunden stehen lassen, danach Proben

30 Min.		in 5 %ige TCE-Lösung		eintauchen
30 "	bei 90°C	" 5 %ige "	"	"
30 "		" 5 %ige "	"	"
30 "	bei 37°C	" Äthanol-Äther-Lösung	1:1	"
30 "	" 37°C	" " "	" 1:1	"

zwischen jeder Auswaschung die Plättchen zum Absaugen einige Minuten auf Filterpapier legen
10 Minuten im Brutschrank bei 90°C auf Filterpapier trocknen lassen
abkühlen
mit 5 ml Toluol-Scintillationslösung in den Scintillationszähler zum Messen geben
als Leerwert ein bis zwei Plättchen mitgeben

b) Proteinbestimmung mit Biuret nach Weichselbaum

(Institut für Toxikologie, Tübingen)
0,2 ml Mikrosomensuspension
1,2 ml 10 %iges Na-Desoxycholat
mischen
15 Minuten warten, bis die Lösung klar ist
0,6 ml 0,2 %iges NaOH
4 ml Biuret-Reagenz
4 ml Harnstoff-Thymol-Lösung
30 Minuten in ein Wasserbad von 40°C stellen
ablesen bei 555 nm im Zeiss-Spektralphotometer
PMQ II gegen Leerwert: dest. H_2O + Reagenzien
Proteingehalt in Gamma pro Ansatz nach Eichkurve berechnet

c) Lösungen

10 %ige Na-Desoxycholat-Lösung (Merck 6504)
Biuret-Reagenz nach Weichselbaum:
9 g Na-K-Tartrat in 400 ml 0,2 n NaOH (CO_2-frei) unter Rühren lösen

3 g $CuSO_4.5\ H_2O$ nach Lösen zugeben (Merck 2790)
5 g KJ (Merck 5043) hinzufügen
mit 0,2 n NaOH auf 1 000 ml auffüllen

Harnstoff-Thymol-Lösung:
300 g Harnstoff (Merck 8487)
erbsengroßes Stück Thymol (Merck 8167)
700 ml dest. H_2O
in der Hitze lösen
mit 3 g Aktivkohle schütteln
klar filtrieren
das Filtrat mit dest. H_2O auf 1 000 ml auffüllen

5) Isolierung des Albumins aus dem Blutplasma

Nach Jungblut und Turba (42)

Die Proteine aus heparinisiertem Rattenplasma wurden mit 25 %iger TCE (Endkonzentration 12,5 %) gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag (bei 3 500 Upm) wurde mit 95 %igem Äthanol (gleiches Volumen wie eingesetzte Plasmamenge) bei Zimmertemperatur extrahiert. Nach Abtrennung der ungelösten Proteine durch Zentrifugation (30 Minuten, 3 500 Upm, $0^{\circ}C$) wurde der alkoholische Extrakt auf minus $15^{\circ}C$ gekühlt und mit drei Volumina Diäthyläther gleicher Temperatur versetzt. Gut gemischt durch Umschwenken. Abzentrifugieren der entstandenen Fällung (30 Minuten, 3 500 Upm, minus $15^{\circ}C$). Nach Abgießen des Überstandes und Abtropfen der umgestülpten Zentrifugengläser bei minus $15^{\circ}C$ wurde der Niederschlag in eiskaltem dest. H_2O gelöst. Danach Dialyse gegen dest. H_2O bei $4^{\circ}C$ über ein bis zwei Stunden und Gefriertrocknung.

6) Isolierung des Albumins aus den Lebermikrosomen (Beschallungsalbumin)

Nach Campbell und Sargent (20)

Die in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendierten Mikrosomen von ungefähr 5 Gramm Leber wurden 2 Minuten in der "Ultrasonic

Power Unit" (MSE) bei 1,5 Ampère beschallt. Danach bis auf minus 15°C eingefroren, wieder aufgetaut und mit 34 000 Upm (90 000 g) in der Spinco-Zentrifuge eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde lyophylisiert (ungefähr 48 Stunden pro Versuch). Der trockene Extrakt wurde dann in 1 ml 0,05 m Na-Citrat/HCl Puffer, pH 2,4, 15 Minuten leicht geschüttelt, das Präzipitat bei 3 500 Upm abzentrifugiert und der Überstand über dest. H_2O über 12 Stunden bei 4°C dialysiert. Das entstandene Präzipitat wurde bei 3 500 Upm abzentrifugiert und der Überstand wiederum über 48 Stunden pro Versuch lyophylisiert.

Durch eine Verlängerung der Beschallungszeit über 2 Minuten hinaus wird die Albuminausbeute nicht größer, aber durch eine Verkürzung unter 1,5 Minuten wird sie erheblich kleiner.

7) Bestimmung der spezifischen Aktivität des Albumins im Plasma und in den Lebermikrosomen

a) Aktivitätsbestimmung

Das lyophylisierte Albumin wurde je nach Ausbeute beim Plasma in 3 bis 5 ml und bei den Lebermikrosomen in 0,5 bis 1,5 ml eiskaltem dest. H_2O gelöst. Davon wurden 0,1 ml auf Filterpapierplättchen aufgetragen, 30 Sekunden in warmer Luft und 10 Minuten bei 90°C im Brutschrank getrocknet. Danach mit 5 ml Toluol-Scintillationslösung zum Messen gegeben.

b) Albuminbestimmung

Leicht modifiziert nach Lowry und Mitarbeitern (1951)
0,1 ml Albuminlösung mit ungefähr 2 ml 1 n NaOH verdünnen.
Zur Messung: 5 ml Cu-Carbonat-Lösung
0,5 ml mit 1 n NaOH verdünnte Proteinlösung
10 Minuten stehen lassen
0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck 9001)
dieses wird 1:1 mit dest. H_2O verdünnt und somit 1 n gemacht

Nach 30 Minuten bei 578 nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II ablesen. Albumingehalt in Gamma pro Ansatz nach Eichkurve berechnet.

Lösungen: 1) 2 % Na_2CO_3 in dest. H_2O
2) 1 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ + 2 % Na-K-Tartrat 1:1 gemischt

Lösung (2) erst getrennt herstellen, dann 50 ml von (1) mit 1 ml von (2) mischen, vor Gebrauch mindestens einen Tag stehen lassen. Das Gemisch ist im Kühlschrank unbegrenzt haltbar.

Die Werte wurden in Ipm/mg Albumin angegeben.

8) Bestimmung der Aktivität im eiweißfreien Cytosol der Leberzelle

Stark modifiziert nach Schimke (82)

Es handelt sich hier um einen TCE-Extrakt des Cytosols. Um den Werten dieser Methode eine (gewisse) Gültigkeit geben zu können, muß die Leber nahezu blutfrei sein. Deswegen wurde in den Fällen, in denen eine gute Entblutung nicht gewährleistet war, die Leber mit 0,9 %iger NaCl-Lösung perfundiert. Die Aufbereitung erfolgte wie im Schema Seite 13. Nach der ersten Zentrifugation bei 40 000 Upm wurde die obere milchige Phase (Fett) des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann 1 ml des Überstandes mit 1 ml 10 %iger TCE gut gemischt, so daß alle Proteine ausgefällt wurden, einige Zeit stehen gelassen und den Niederschlag abzentrifugiert. 0,5 ml des so entstandenen Überstandes, der freie Aminosäuren enthält, wurden in 10 ml Dioxan-Naphthalin-Scintillationsflüssigkeit gemessen. Die abgelesenen Impulszahlen sind auf das Lebergewicht bezogen: Ipm/g Leber.

9) Bestimmung der Aktivität des Plasmas

0,1 ml Plasma wurden auf ein Filterpapierplättchen aufgetragen, wie üblich getrocknet und mit 5 ml Toluol-Scintillations-

flüssigkeit zur Messung gegeben: Ipm/ml Plasma. Diese Bestimmung sollte als Hinweis dienen, daß die eingespritzten radioaktiven Aminosäuredosen bei Kontrollen und behandelten Tieren gleich waren, ferner, daß die Injektion intravenös und nicht paravenös erfolgt war.

Als gültig wurden die Werte von 16 000 bis 25 000 Ipm/ml Plasma innerhalb der ersten zwei Stunden nach Injektion von 5 µCi angesehen.

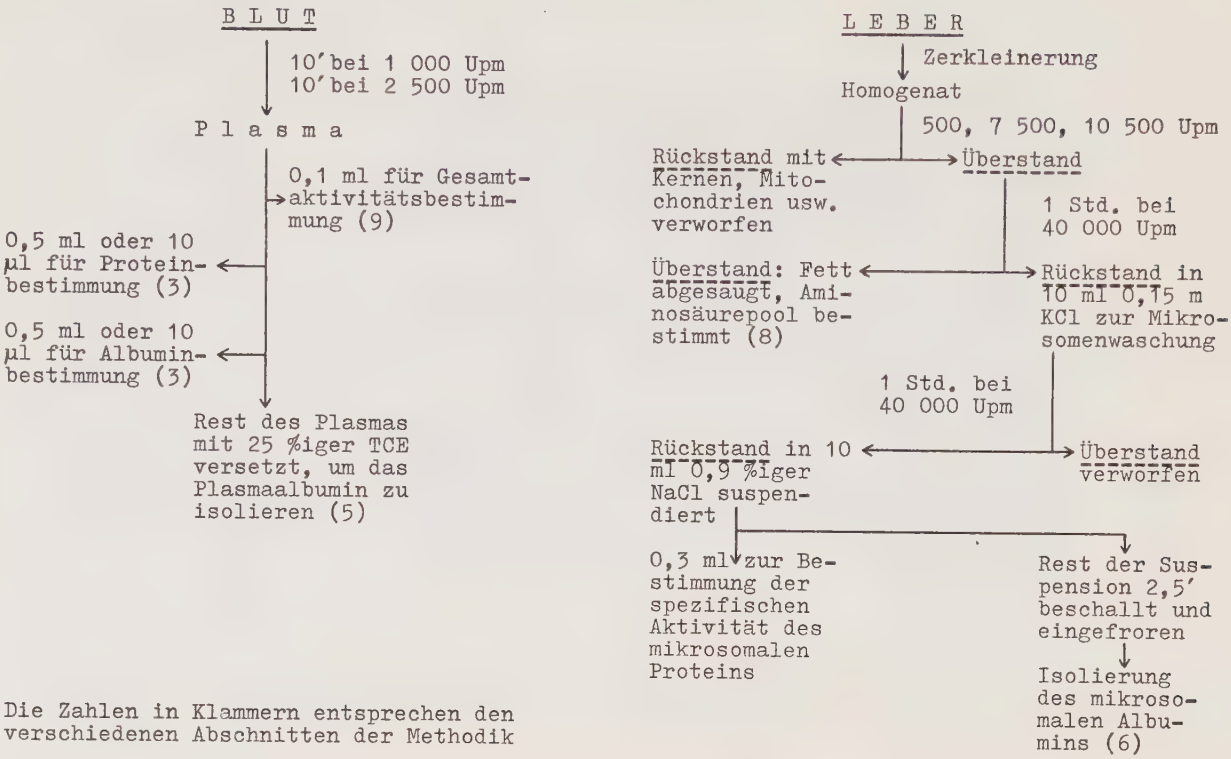
10) Elektrophorese

Es wurde eine Zonenelektrophorese unter Verwendung von Zelluloseacetat-Folien als Trägermedium verwendet.

Apparatur: Beckmann-Mikrozonen-Elektrophorese-System
Modell R-100
Puffer: Beckmann B-2 Puffer, pH 8,6, Ionenstärke 0,075
Membranen: Zelluloseacetat-Folien (millipore Filter Corporation)
Spannung: 250 Volt
Stromstärke: Anfangsstromstärke: 3,5 bis 5,8 mA
Endstromstärke: 4,5 " 9,5 mA
Trennzeit: 20 Minuten
Färbung: Farbstoff Ponceau-S
Waschung: 5 Vol.% Essigsäure
Transparentmachung: 25 bis 30 Vol.% Eisessig und
70 bis 75 Vol.% Methanol
Alkoholbad: gleiche Alkoholkonzentration wie Transparenzlösung

Jedes Plasma und jede Albuminlösung wurde je einmal in einfacher und doppelter Menge aufgetragen.

Allgemeiner Verlauf eines Versuches



Die Zahlen in Klammern entsprechen den verschiedenen Abschnitten der Methodik

ERGEBNISSE

I) Versuche zur Methodik

1) Reinheit des isolierten Albumins: Die Albuminisolierung mußte aus verschiedenen Geweben und mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Deshalb war es notwendig festzustellen, ob bei der gebrauchten Methodik das erhaltene Albumin derselben Fraktion entsprach. Dies wurde mit einer Zelluloseacetat-Elektrophorese durchgeführt (Abb. 1). Das isolierte Albumin aus Plasma und Lebermikrosomen ist in gleicher Weise wie die Albuminbande des Ratten- und Humanplasmas gewandert.

2) Applikationsform der markierten Aminosäuren: In einem zweiten Vorversuch wurde nachgeprüft, ob und welche Unterschiede zwischen einer intraperitonealen und intravenösen Applikation (1, 2) der radioaktiv markierten Aminosäuren bestanden. Der Anlaß dafür war, daß bei manchen Arbeiten die intraperitoneale (50, 51, 85) oder gar intramuskulare (64) und in anderen die intravenöse Verabreichung (12, 30, 70) benutzt worden war. Ein weiterer Grund zu dieser Untersuchung war die große Anzahl von Versuchstieren, die innerhalb kurzer Zeit gespritzt und geschlachtet werden mußten, so daß es sehr günstig gewesen wäre, wenn man die Versuche mit einer intraperitonealen Applikation hätte durchführen können. In diesem und auch in den nächsten Versuchen konnte festgestellt werden, daß bei einer intraperitonealen Applikation die Streuung der Werte relativ groß war und bei längerer Phenobarbitalbehandlung einige der Tiere durch ihre extrem niedrigen Werte auffielen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß eine chronische intraperitoneale Applikation von Phenobarbital einen peritonealen Reiz verursacht, der eine unbekannte Resorptionsstörung der markierten Aminosäuren mit sich bringt (Tab. I). Deswegen wurde die intravenöse Injektion bevorzugt, obwohl einige der Versuche mit intraperitonealer Applikation der markierten Aminosäuren durchgeführt wurden.

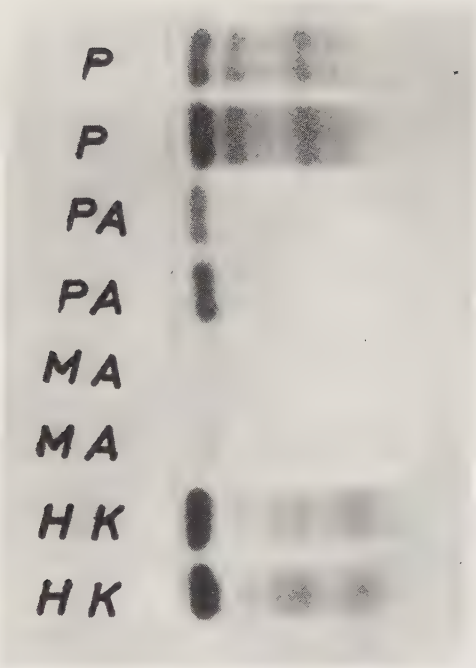


Abbildung 1

Zelluloseacetat-Elektrophorese von Rattenplasma (P), isoliertem Plasmaalbumin (PA), isoliertem mikrosomalem Albumin (MA) und Humanplasma-Kontrolle (HK) jeweils in einfacher und doppelter Menge aufgetragen

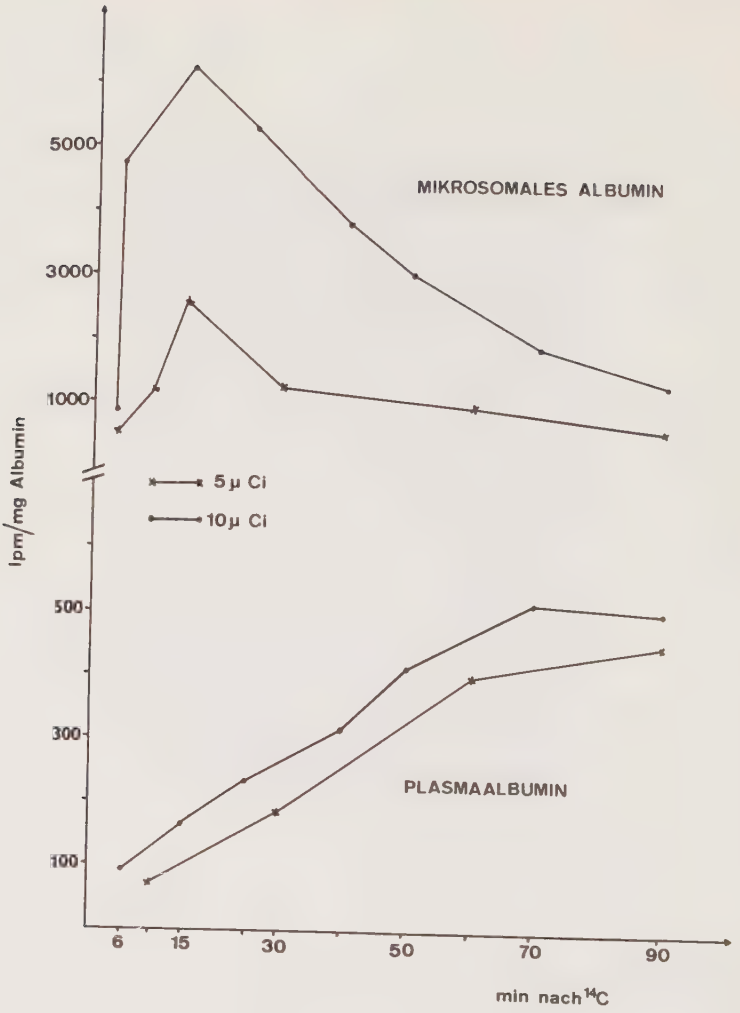


Abbildung 2

Spezifische Aktivität-Zeit-Kurven des mikrosomalen Albumins und des Plasmaalbumins bei Dosen von 5 und 10 µCi ^{14}C-Protein-hydrolysat (i.p.)

In diesem Versuch konnte außerdem beobachtet werden, daß die Höhe der spezifischen Aktivität bei intraperitonealer und intravenöser Verabreichung der markierten Aminosäuren gleich war, daß aber zwischen beiden Applikationsarten eine Verschiebung der Werte vorlag. Die intraperitonealen Werte waren um 3 bis 5 Minuten verspätet. Vergleiche die Abbildungen 2, 3, 4 und 6.

3) Es mußte auch festgestellt werden, in welcher Menge und in welchen Zeiten vor dem Schlachten die markierte Substanz eingespritzt werden sollte, um die Untersuchungen unter optimalen Bedingungen durchzuführen und auch die Kosten in annehmbaren Grenzen zu halten.

Über die Dosen gab es einige Hinweise (12, 30, 70, 85). Die meisten Autoren verwendeten durchschnittlich 10 µCi pro 100 Gramm Körpergewicht, aber dies bei verschiedenen Arten von Aminosäuren. In diesem Versuch galt es, eine optimale und möglichst kleine Dosis für das ^{14}C-Proteinhydrolysat zu finden und gleichzeitig das Verhalten des durch die eingespritzten ^{14}C-Aminosäuren markierten Albumins zu verfolgen.

Um das erste Vorhaben zu erreichen, wurden Dosen von 5 oder 10 µCi ^{14}C-Proteinhydrolysat intraperitoneal gespritzt. Um das Verhalten des markierten Albumins zu verfolgen, wurden die Tiere 5, 10, 30, 60 und 90 Minuten nach der ^{14}C-Injektion geschlachtet. Für jeden Zeitpunkt wurden je ein bis zwei Ratten verwendet (Abb. 2, Tab. II). Hieraus geht hervor, daß die Dosis von 5 µCi für 100 bis 110 Gramm Körpergewicht ausreicht. Es bestand eine spezifische Aktivitätsdifferenz von nur 20 % im Plasmaalbumin und von 40 bis 60 % im mikrosomalen Albumin. Die Kurven zeigen bei beiden Dosen eine ähnliche Form Deswegen wurde in späteren Versuchen generell eine Dosis von 5 µCi verwendet.

Außerdem konnte schon bei diesem Vorversuch festgestellt werden, daß deutliche Schwankungen in den Werten auftraten, sobald das Körpergewicht um mehr als 15 Gramm höher oder niedriger war. Daher wurde bei den späteren Versuchen darauf ge-

achtet, Ratten von 100 bis 110 Gramm zu verwenden und innerhalb eines Versuches zum behandelten Tier ein Kontrolltier mit gleichem Gewicht zu finden. Solche Schwankungen treten vor allem in den spezifischen Aktivitäten des Plasmaalbumins deutlich hervor (vergl. mehrere Tabellen), da die Blutmenge parallel zum Körpergewicht ansteigt und sofort ein Verdünnungseffekt auftritt (15). Dies ist wiederum in den mikrosomalen Werten fast nicht zu bemerken, da das Lebergewicht nicht proportional mit dem Körpergewicht zunimmt (35).

4) Um eine Vorstellung zu erhalten, inwieweit die Bestimmungen der spezifischen Aktivität vom Albumin in Lebermikrosomen und Plasma verschiedener Tiere voneinander abweichen, wenn die gleichen Bedingungen wie injizierte Menge, Applikationsform und Zeit streng eingehalten werden, erhielten in einem weiteren Versuch Ratten 5 µCi ^{14}C-Proteinhydrolysat intravenös. Nach 10, 30 oder 60 Minuten wurden jeweils sechs Ratten getötet und die spezifische Aktivität nach Isolierung des Albumins in den Mikrosomen und im Plasma gemessen. Die Abweichung des Mittelwerts betrug im allgemeinen ungefähr 6 % mit Ausnahme der spezifischen Aktivität des Plasmaalbumins 10 Minuten nach ^{14}C-Proteinhydrolysat, wo sie 19 % betrug. Auch die Abweichung des Mittelwerts der spezifischen Aktivität des mikrosomalen Albumins 30 Minuten nach ^{14}C-Proteinhydrolysat ist etwas höher (13 %, Tab. III). Die Werte der Tabelle I sind entsprechend.

Φ ist die Gesamtwahrscheinlichkeit in % mit einem Toleranzbereich von $\pm$ 10 %.

II) Versuche mit phenobarbitalbehandelten Tieren

In den folgenden Versuchen wurde neben der spezifischen Aktivität des mikrosomalen Albumins und des Plasmaalbumins die spezifische Aktivität des mikrosomalen Proteins sowie der Protein- und Albumingehalt im Blutplasma bestimmt. Zur Kontrolle der so erhaltenen Meßgrößen wurde noch die Gesamtaktivität im Blutplasma sowie die Aktivität im eiweißfreien Cytosol der Leberzelle bestimmt.

Die Gesamtaktivität des Plasmas zeigt primär an, ob die eingespritzten Aminosäuren "angekommen" sind oder nicht, d.h., daß z.B. beim intravenösen Spritzen nichts paravenös gelaufen ist. Außerdem kann man damit das Verschwinden und die Bewegung des markierten Materials verfolgen. Es ist interessant festzustellen, daß in allen Versuchen (im Versuch Abb. 6 mit intraperitonealer Applikation nicht so deutlich) die Gesamtaktivität des Plasmas zuerst (nach fünf und zehn Minuten) sehr hoch ist, nach 15 bis 30 Minuten niedriger wird, um danach wieder anzusteigen, aber nicht so hoch wie am Anfang (Tab. IV, V und VII). Dieser letzte Anstieg wird durch das Einströmen der Proteine in das Plasma verursacht.

Die Bestimmung der Aktivität im eiweißfreien Cytosol der Leberzelle wurde nicht nur als Kontrolle der Aminosäurebewegung (Abb. 8) durchgeführt, sondern auch in der Hoffnung, ein besonderes Verhalten des Vorläufers verfolgen zu können und festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die Markierung vollständig verschwunden ist, um so einen Anhaltspunkt zu gewinnen, inwieweit eine Wiederverwendung der Aminosäuren bei der Synthese von Albumin eine Rolle spielt. Es ist am Anfang (nach fünf Minuten) sehr hoch markiert, danach verschwindet die Markierung relativ schnell und zwar genauso schnell bei phenobarbitalbehandelten Tieren wie bei den Kontrollen (Tab. IV, V und VII).

Das ^{14}C-Proteinhydrolysat wurde in Dosen von 5 µCi und intravenös (außer im Versuch der Abb. 5 und 6) appliziert. Jeder Wert in den Versuchen der Abbildungen 3, 4, 6 und 7 kam aus der Mischung gleicher Mengen an Leberhomogenat, bzw. Plasma von zwei Ratten zustande.

Der Einfluß des Phenobarbitals auf die Synthese von Albumin in der Leber wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht, nach einmaliger und dreimaliger Gabe und während einer Dauerbehandlung mit Phenobarbital. Außerdem wurde geprüft, wie die Albuminsynthese sich nach einer solchen Phenobarbitalbehandlung verhält.

Bei Mäusen (53), bei Ratten (5, 60) und im Versuch auf Abbildung 10 konnte festgestellt werden, daß in den ersten 5 bis 7 Tagen während einer Phenobarbitalbehandlung die Leber sich stark vergrößert (30 bis 40 %), bis ein bestimmtes Maximum erreicht ist, das nicht weiter überschritten wird. Dementsprechend ist anzunehmen, daß nach acht Tagen Vorbehandlung auch ein neues Fließgleichgewicht ("steady state") in der Albuminsynthese erreicht ist.

a) Versuche vor dem "steady state"

Abbildung 3 zeigt den ersten Versuch, der 7 bis 8 Stunden nach einmaliger Phenobarbitalgabe durchgeführt wurde. Die Versuchsanordnung entspricht dem sogenannten Kurzzeiteinbau oder "pulse-labeling" Verfahren. Sie zeigt deutlich, daß die spezifische Aktivität des mikrosomalen Proteins und Albumins sowie des Plasmaalbumins bei den behandelten Tieren um je 15 - 69 %, 14 - 27 %, bzw. 4 - 31 % höher als bei den Kontrollen ist (Tab. IV).

Im Versuch, 18 bis 19 Stunden nach Phenobarbitalgabe (Abb. 4, Tab. V) zeigt sich, daß die spezifische Aktivität des Albumins im Plasma vor und nach Phenobarbital praktisch gleich ist. Dagegen ist sie im Protein und Albumin der Lebermikrosomen nach Phenobarbitalgabe noch deutlich um 2 bis 54 %, bzw. 8 bis 18 % erhöht.

Der Verlauf der spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven nach Injektion des ^{14}C-Proteinhydrolysates war praktisch von der Vorbehandlung unabhängig. Daher war es möglich, zwei charakteristische Punkte (jeweils das Maximum) der Verlaufskurven herauszugreifen. Nach 10 Minuten war das Maximum der spezifischen Aktivität im mikrosomalen Albumin und nach 60 Minuten das des Plasmaalbumins erreicht. Abbildung 5 zeigt, wie sich der Kurzzeiteinbau von markierten Aminosäuren in das Albumin von Lebermikrosomen und Plasma 5, 10, 20, 30 und 40 Stunden nach der Phenobarbitalgabe verhält. Der Kurzzeiteinbau in das mikrosomale Albumin ist, wie schon in vorangegangenen Versu-

chen (Abb. 3 und 4), innerhalb von 5 bis 10 Stunden sehr deutlich gesteigert und nach 20 bis 30 Stunden wieder zur Norm zurückgekehrt. Auch im Plasmaalbumin findet sich ein gesteigerter Einbau in den ersten 5 bis 10 Stunden, aber 20 bis 40 Stunden nach Phenobarbital sinken die Einbauwerte weit unter die Norm (Tab. VI).

Ein letzter Versuch (Abb. 6) wurde nach drei Phenobarbitalgaben (einmal täglich) und zwölf Stunden nach der letzten Gabe durchgeführt. Die spezifische Aktivität nach Kurzzeiteinbau in das Albumin ist hier stets bei den behandelten Tieren sowohl in den Lebermikrosomen wie auch im Plasma um 2 bis 43 %, bzw. 4 bis 40 % niedriger als bei den nicht behandelten Tieren. Die Differenzen zwischen behandelten und nicht behandelten Ratten sind beim mikrosomalen Protein deutlicher und betragen 7 bis 50 %. In diesem Versuch wurde auch das ^{14}C-Proteinhydrolysat intraperitoneal appliziert und die Protein- und Albumingehaltsbestimmung im Plasma nicht durchgeführt (Tab. VII).

b) Versuche im "steady state"

Bei diesen Versuchen wurde täglich einmal während acht Tagen vorbehandelt, in der Annahme, daß diese Zeit genüge, um ein neues Gleichgewicht zu gewährleisten. Nach etwa sieben Tagen (Tab. XI) kommt das Leberwachstum, das durch Phenobarbital induziert wird, zum Stillstand. Deshalb wurde der Kurzzeiteinbau zwölf Stunden nach der achten Gabe wie in den vorhergegangenen Versuchen untersucht und dann die Abnahme der spezifischen Aktivität während 72 Stunden verfolgt. Um die Bedingungen des "steady state", unter denen dieser Versuch erfolgte, aufrechtzuerhalten, bekamen alle Tiere bis zur Schlachtung weiterhin täglich eine Phenobarbitalgabe. Eine Zeit von 11 bis 12 Stunden bis zur Schlachtung wurde deshalb gewählt, weil während dieser Zeit die bekannte pharmakologische Wirkung des Phenobarbitals praktisch verschwunden ist (80).

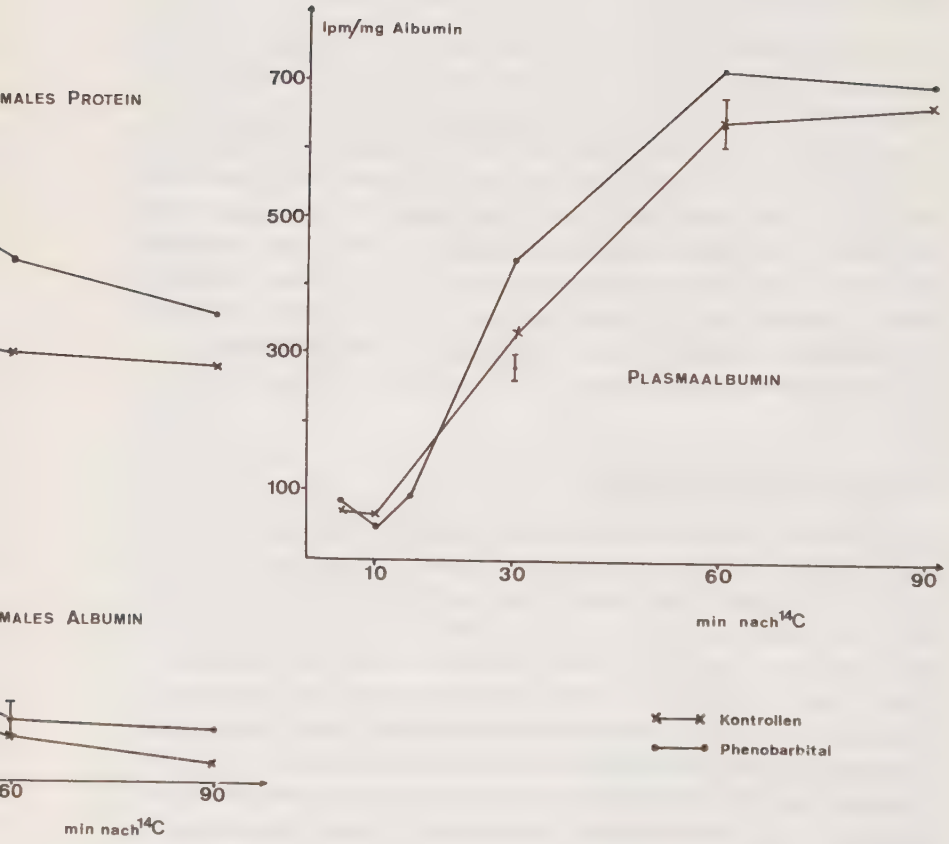


Abbildung 3

Spezifische Aktivitäts-Zeit-Kurven des mikrosomalen Proteins und Albumins und des Plasmaalbumins 7 bis 8 Stunden nach einmaliger Phenobarbitalgabe
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

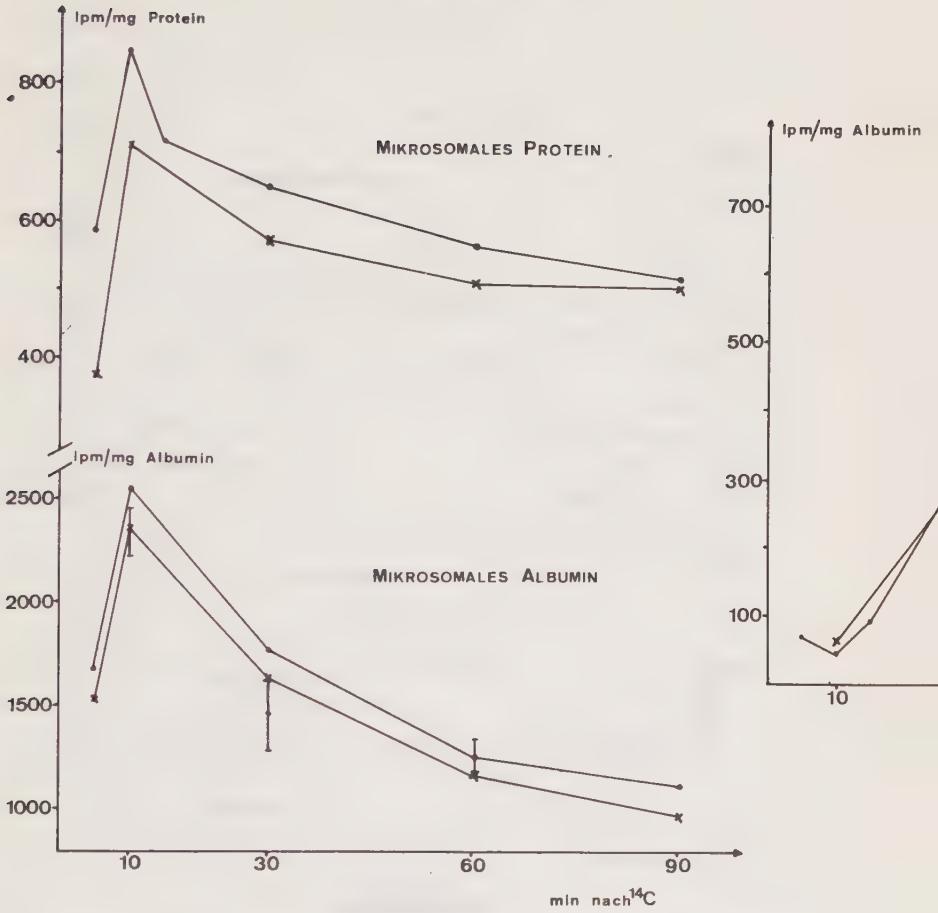


Abbildung 4

Spezifische Aktivität-Zeit-Kurven des mikrosomalen Proteins und Albumins und des Plasmaalbumins 18 bis 19 Stunden nach einmaliger Phenobarbitalgabe
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

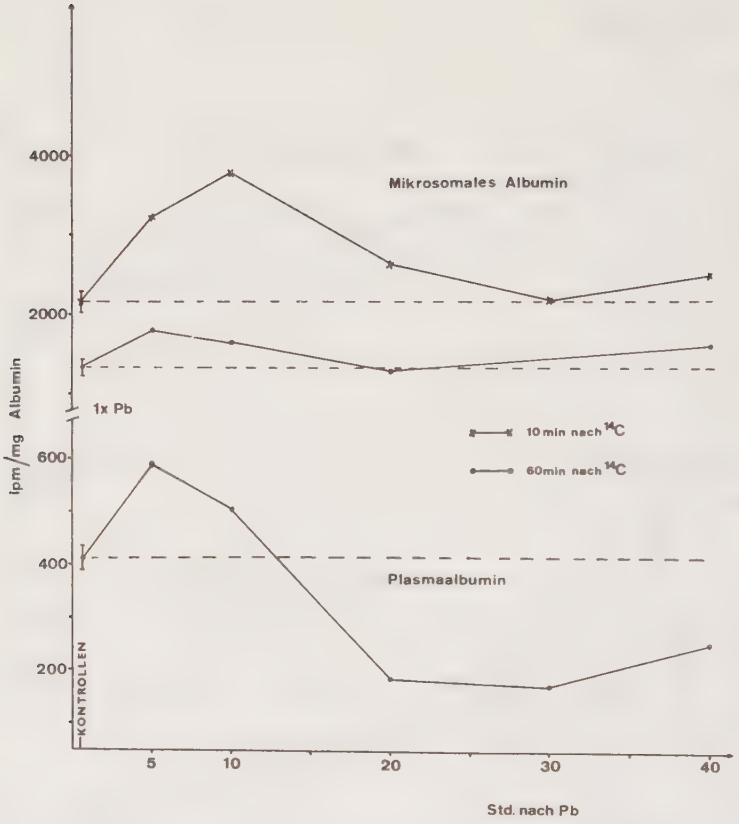


Abbildung 5

Kurzzeiteinbau-Kurven (nach 10 und 60 Minuten) des mikrosomalen Albumins und Plasmaalbumins nach einmaliger Phenobarbitalgabe
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.

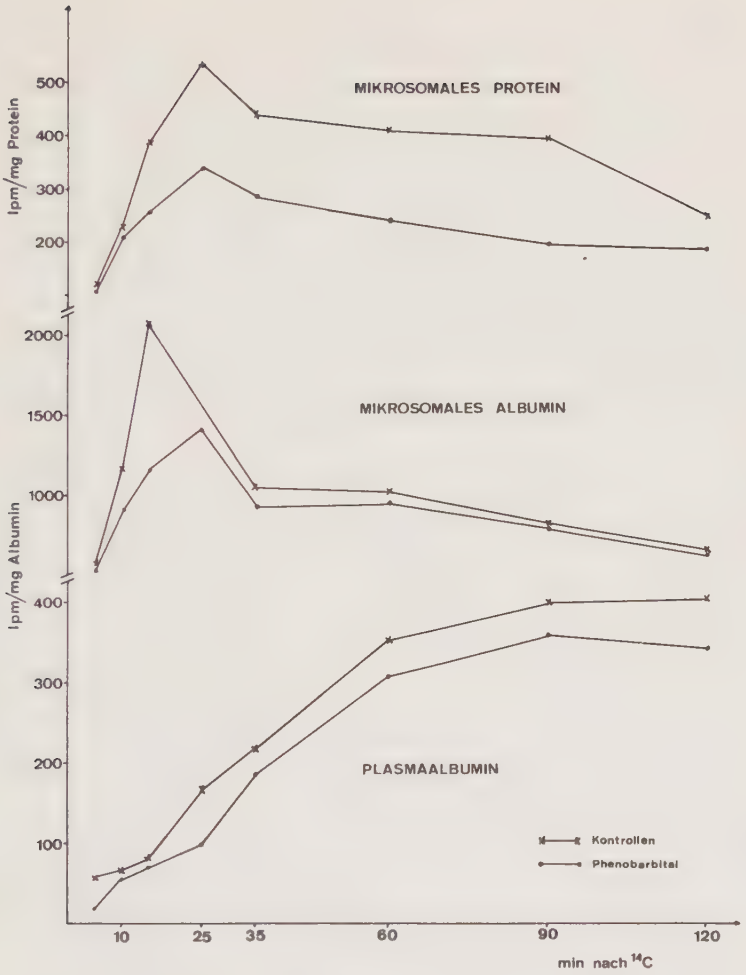


Abbildung 6

Spezifische Aktivität-Zeit-Kurven des mikrosomalen Proteins und Albumins und des Plasmaalbumins nach dreimaliger Phenobarbitalgabe
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.

Abbildung 7 (Tab. VIII und IX) zeigt, daß wie im vorhergehenden Versuch (drei Phenobarbitalgaben) die spezifische Aktivität im mikrosomalen Albumin bei den behandelten Tieren nicht so stark anstieg wie in den Kontrollen (3 bis 36 %). Nach ein bis zwei Stunden sind die spezifischen Aktivitäten bis zum Ende des Versuches fast konstant. In diesem Versuch kam auch deutlich ein verzögerter Anstieg der spezifischen Aktivität des Plasmaalbumins unter Phenobarbitalwirkung zum Ausdruck. Noch nach zwei Stunden waren die Werte um 5 bis 25 % niedriger, nach sechs Stunden dagegen etwas höher als bei den behandelten Tieren. Zwischen der zweiten und sechsten Stunde überschneiden sich die spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven behandelter und nicht behandelter Tiere deutlich.

Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß sechs Stunden nach Gabe des ^{14}C-Proteinhydrolysates die spezifische Aktivität des Albumins im Plasma nahezu gleich war mit derjenigen des Albumins in den Lebermikrosomen. Nach Phenobarbitalbehandlung war die spezifische Aktivität des Albumins im Plasma sogar höher als in den Lebermikrosomen. Der etwas höher liegende Wert im Plasma (707 Ipm) im Vergleich zum mikrosomalen Wert (628 Ipm) ist sehr wahrscheinlich auf die unvermeidliche Streuung zurückzuführen. Man sollte annehmen, daß beide Werte in etwa gleich sind. Das bedeutet aber, daß bereits zwischen der zweiten und sechsten Stunde nach Gabe markierter Aminosäuren ein vollständiger Austausch zwischen mikrosomalem Albumin und Plasmaalbumin stattgefunden hat. Das mikrosomale Protein verhält sich analog zum Albumin, obwohl beim Protein die Differenzen zwischen den behandelten (um 5 bis 18 % erniedrigt) und den nicht behandelten Tieren über die ganze Versuchsdauer anhalten.

Die erniedrigte spezifische Aktivität des mikrosomalen Proteins und Albumins phenobarbitalbehandelter Tiere beruht sehr wahrscheinlich auf einem Verdünnungseffekt. Um diesen Effekt soweit wie möglich auszuschalten, wurde eine Korrektur dieser Werte vorgenommen, indem die spezifische Aktivität mittels

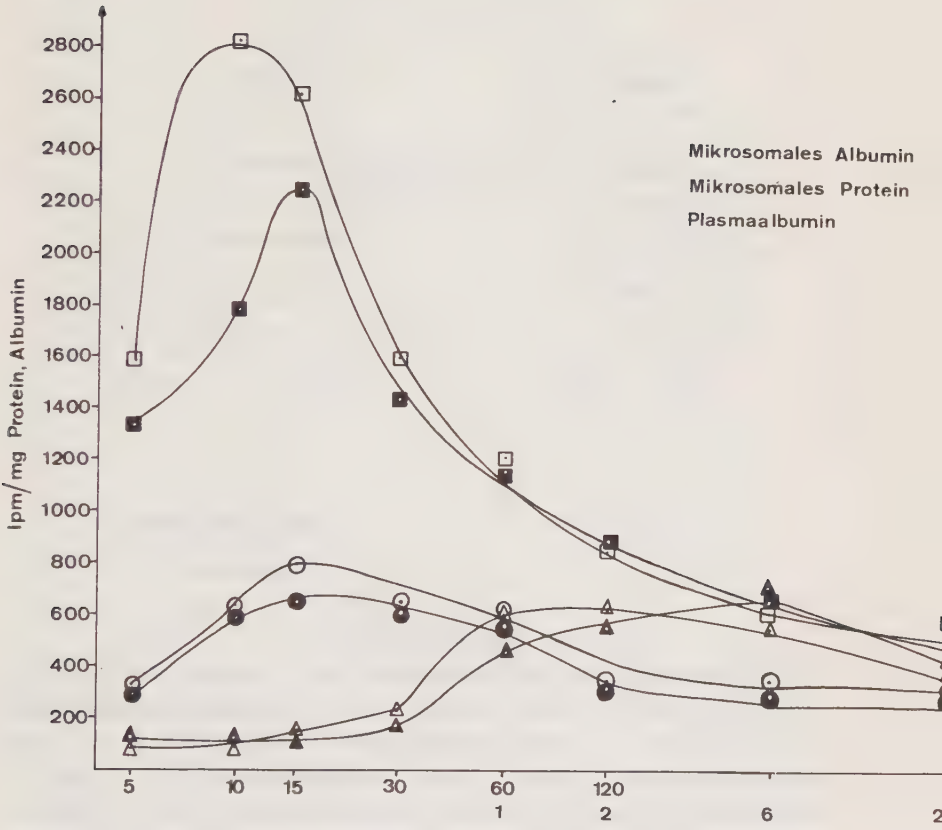


Abbildung 7

Spezifische Aktivität-Zeit-Kurven des mikrosomalen Proteins und Albumins und des Plasmaalbumins nach acht Tage langer Phenobarbitalbehandlung, "steady state", logarithmische Auftragung der Zeit; ^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

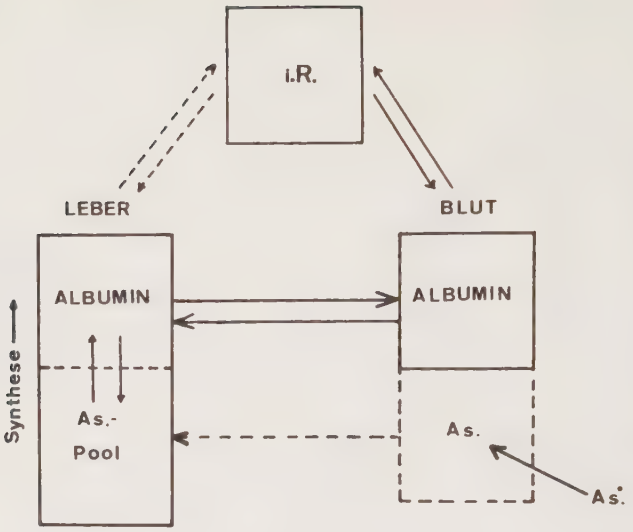


Abbildung 8

Der untersuchte Albuminstoffwechselteil schematisch in einem Dreikammern-System dargestellt. Die beiden Hauptkammern (Leber und Blut) sind in zwei Kompartimente unterteilt. In der Leber sind diese Kompartimente durch Albuminsynthese und -abbau verbunden. Der in das untere Kompartiment des Blutes einmündende Pfeil deutet die Einspritzung der markierten Aminosäuren an. Die obere Kammer entspricht dem interstitiellen Raum (i.R.).

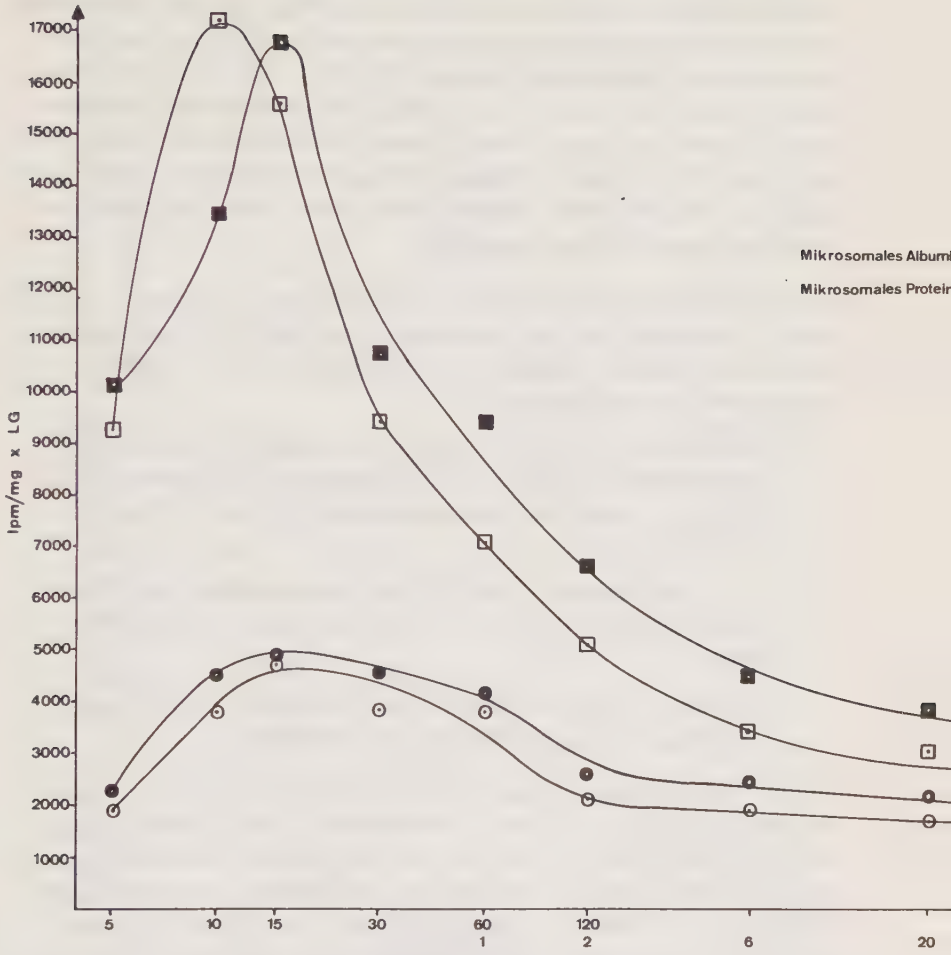


Abbildung 9

Spezifische Aktivität-Zeit-Kurven des mikrosomalen Proteins und Albumins nach Korrektur mittels Multiplikation mit den Mittelwerten der Lebergewichte. Die Zeit wurde logarithmisch aufgetragen.

Multiplikation auf das Gesamtlebergewicht der Kontrollen wie auch der behandelten Tiere (Mittelwert von je sechs Ratten) bezogen wurde. Ähnliche Korrekturen wurden bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität mikrosomaler Enzyme vor und nach Phenobarbitalbehandlung gemacht (32, 54). Wie die Abbildung 9 zeigt, liegt die korrigierte spezifische Aktivität phenobarbitalbehandelter Tiere bereits nach 15 Minuten höher als bei den Kontrollen. Das bedeutet, daß auch im "steady state" mehr Albumin, bzw. Protein synthetisiert wird, wenn die Tiere unter Phenobarbitalwirkung stehen.

Das Verhalten der mikrosomalen Proteine ist in diesen beschriebenen Versuchen auch von Bedeutung. Auf den verschiedenen Abbildungen sind die Kurven dieser Proteine aufgezeichnet. Es fallen drei Tatsachen auf:

1) Eine Parallelität im Verhalten zwischen mikrosomalen Proteinen und Albumin. Die Grundform der Kurven ist gleich, obwohl der Zehn-Minuten-Peak beim Albumin deutlicher ist.

2) Die spezifische Aktivität der mikrosomalen Proteine ist stets um 20 bis 45 % niedriger als die des Albumins.

3) Die spezifische Aktivität der Proteine bleibt länger erhöht, d.h., der Abfall ist langsamer.

In einem weiteren Versuch wurde der Kurzzeiteinbau von markierten Aminosäuren in das Plasmaalbumin über mehrere Tage hin untersucht, um die in den vorangegangenen Versuchen gemessenen Resultate zu überprüfen. Daher wurde während einer Phenobarbitalbehandlung von zehn Tagen, 12 bis 13 Stunden nach jeder (täglichen) Phenobarbitalgabe, der Kurzzeiteinbau 60 Minuten nach Gabe des ^{14}C-Hydrolysates gemessen (Abb. 10). Wie schon in den anderen Versuchen beobachtet, war nach der ersten Phenobarbitalgabe die spezifische Aktivität deutlich höher als bei den Kontrollen. Aber bereits nach der zweiten Gabe blieb die spezifische Aktivität deutlich unterhalb der

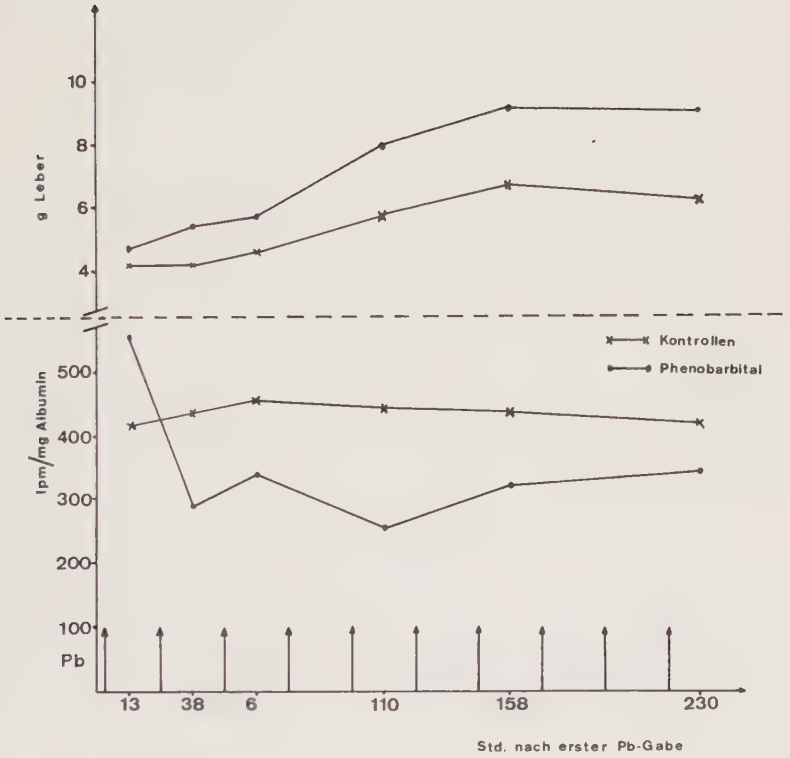


Abbildung 10

Verhalten der Lebergewichte während des Versuchs und Kurzzeiteinbau nach 60 Minuten in das Plasmaalbumin während einer 10 Tage langen Phenobarbitalbehandlung
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.

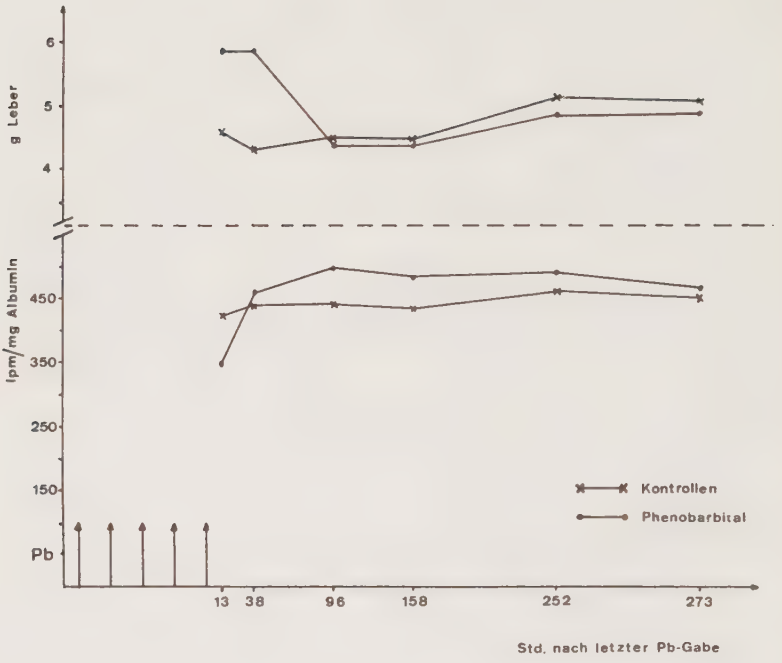


Abbildung 11

Verhalten der Lebergewichte und Kurzzeiteinbau nach 60 Minuten in das Plasmaalbumin nach Abbruch einer 5 Tage langen Phenobarbitalbehandlung
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.

Kontrollwerte und änderte sich nur wenig während der gesamten Behandlungszeit. Die Lebergewichte der behandelten Tiere waren immer höher als die der Kontrollen. Das Ansteigen der Kurven entspricht dem natürlichen Wachstum der Leber und der Lebervergrößerung durch Phenobarbital (bis zum fünften Tag ungefähr), (Tab. XI).

Im letzten Versuch (Abb. 11, Tab. XII) wurde festgestellt, was nach Absetzen der Phenobarbitalbehandlung geschieht. Die Tiere wurden fünf Tage lang einmal pro Tag wie üblich vorbehandelt und 13, 38, 96, 158, 252 und 372 Stunden nach der letzten Phenobarbitalgabe geschlachtet. Wie im vorigen Versuch wurde das ^{14}C-Hydrolysat 60 Minuten vor der Schlachtung gespritzt, nur die spezifische Aktivität des Plasmaalbumins untersucht und die Lebergewichte aufgetragen. 13 Stunden nach der letzten Phenobarbitalgabe war die spezifische Aktivität bei den behandelten Tieren niedriger als bei den Kontrollen. Nach 38 Stunden war der Wert bei den behandelten Tieren schon etwas höher, blieb 5 bis 6 Tage erhöht und näherte sich dann wieder den Kontrollwerten. Das Lebergewicht war 38 Stunden nach der letzten Phenobarbitalgabe erhöht und erreichte dann am dritten bis fünften Tag die Kontrollwerte. Danach blieben die Werte der behandelten Tiere etwas unterhalb der Kontrollen. Wieder verliefen die Leberwerte durch das natürliche Leberwachstum ansteigend.

INTERPRETATION UND DISKUSSION

Es ist bekannt, daß die Untersuchung der Proteinsynthese mit markierten Aminosäuren sehr eindrucksvolle Daten liefern, deren Interpretation aber häufig unzureichend und fehlerhaft ist (51). Deswegen wurde in vielen Arbeiten immer wieder versucht, die Daten durch eine mathematische Behandlung zu objektivieren, obwohl auch dieses Verfahren nur eine Näherung (61, 73, 81) erlaubt. Daher tritt die Frage auf, ob bei pharmakologischen Untersuchungen mit markierten Substanzen die bei den physiologischen Untersuchungen bevorzugte mathematische Interpretation zu umgehen ist oder nicht. Es ist zu bedenken, daß in der Physiologie von vornherein keine Bezugsgrößen vorhanden sind, sondern absolute Werte angestrebt werden. In den pharmakologischen Untersuchungen dagegen kann man die mathematischen Überlegungen umgehen, wenn man von Anfang an nur auf vergleichende Untersuchungen abzielt. Die auf diese Weise erhaltenen relativen Werte genügen, um Aussagen machen zu können.

Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Pharmaka auf den Proteinstoffwechsel in der Leber erfolgten erst vereinzelt (9, 56, 86, 87, 88). Doch beschränken sich diese Autoren meistens darauf, etwas über einen gesteigerten oder gehemmten Einbau der eingespritzten markierten Aminosäuren auszusagen. Kenny (50), Shuster und Jick (87), Schimke (82) und Schimke und Mitarbeiter (83) gehen schon einen Schritt weiter und verwenden den sogenannten Kurzzeiteinbau ("pulse-labeling") als Maß für die Syntheserate "in vivo". Zuletzt machen Schimke (82), Shuster und Jick (87) und Greim (31) nach ähnlichen Überlegungen sogar Angaben über Synthese- und Abbaurate, obwohl die oben erwähnten Autoren noch nicht wagten, derartige Schlüsse zu ziehen. Damit nähern sich diese Autoren den Zielen der physiologischen Untersuchungen, die sich mit dem Einfluß von Pharmaka auf den Proteinstoffwechsel befassen und die "in vivo" unter ganz verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt worden sind (44), so daß es keine einheitlichen Modelle für diese Art Untersuchungen gibt.

Bei In-vitro-Versuchen ist eine Interpretation der Ergebnisse relativ eindeutig, da ein geschlossenes System vorliegt. Bei dieser Art von Versuchen kann man mit Sicherheit annehmen, daß die Menge der eingebauten Aminosäuren der Syntheserate entspricht (44). Anders ist es bei den In-vivo-Versuchen, in denen das vorliegende offene System unter dem Einfluß vieler Faktoren (Hormone, Verdünnungseffekte, Wiederverwendung der Aminosäuren) steht. Man kann natürlich versuchen, diese Einflüsse auszuschalten, indem z.B. adrenalektomierte Tiere verwendet werden und der Versuch im akuten Stadium der Behandlung durchgeführt wird (52), um eben einen Verdünnungseffekt und eine Wiederverwendung der Aminosäuren zu vermeiden. Damit schränkt man jedoch die Versuchsmöglichkeiten ein.

Auch in der vorliegenden Untersuchung muß eine Wiederverwendung der Aminosäuren in Kauf genommen werden. Sie verursacht eine Verzögerung der Abfallkurven und erschwert die Bestimmung der biologischen Halbwertzeit des Albumins bei Kontrollen und bei phenobarbitalbehandelten Tieren. Deswegen ist es eigentlich sinnlos, Versuche mit markierten Aminosäuren auf längere Zeit durchzuführen, um danach quantitative Aussagen machen zu wollen. Bei der relativ kurzen biologischen Halbwertzeit des Albumins (15) darf man diese Wiederverwendung nicht vernachlässigen. Um die biologische Halbwertzeit eines Proteins im Blutplasma zu messen, entgingen R. M. Campbell und Mitarbeiter (15), Maurer (61) und andere Autoren diesem Fehler, indem sie markierte Proteine anstatt markierter Aminosäuren injizierten.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine immunologischen Methoden verwendet, weshalb auf eine absolute Reinheit des auf verschiedene Weise isolierten Albumins verzichtet werden mußte, obwohl durch elektrophoretische Trennung bewiesen werden konnte, daß es sich um gleiche Fraktionen handelt. Peters (69, 70) verwendet fast zu jeder Albuminisolierung immunologische Verfahren, aber beabsichtigt ist fast immer nur die Isolierung von unmittelbaren Vorläufern und Zwischenprodukten des Albumins aus den verschiedenen Zellfraktionen. Für diese

Zwecke sind natürlich immunologische Methoden unumgänglich (43). In der vorliegenden Arbeit wurde das Albumin nach Beschallung der Lebermikrosomenfraktion gewonnen. Obwohl die Ausbeute sehr klein ist, besitzt das Albumin einen großen Reinheitsgrad, wie Campbell und Sargent (20) gezeigt haben. Dadurch war es möglich, immunologische Verfahren zu umgehen.

Bei der Isolierung des Albumins aus dem Blutplasma (42) erhält man ein Albumin mit nur 1 % Verunreinigungen. Um einen Vergleich zwischen unbehandelten und behandelten Tieren zu ziehen, wie es hier der Fall ist, haben die geringen Verunreinigungen keinen Einfluß auf die Ergebnisse (85).

Da es nicht möglich war, die verschiedenen Albuminfraktionen in der Leber quantitativ zu bestimmen, beschränkten sich die vorliegenden Untersuchungen auf die Messung der spezifischen Aktivität. Bisher gibt es noch keine Methode, das gesamte Albumin der Leber zu erfassen. Auch Autoren wie Peters und Campbell umgingen eine quantitative Messung der Albuminfraktionen in der Leber.

Die Bestimmung der Konzentration des Plasmaalbumins kann gewisse Hinweise dafür liefern, in welcher Richtung die Albuminmenge im Blut sich verändert. Allerdings können solche Schlüsse nur mit großer Vorsicht gezogen werden, da eine Konzentrationsmessung keine exakte Angabe über die im Plasma vorliegende Gesamtmenge an Albumin vermittelt. Dazu wäre eine genaue Bestimmung des Plasmavolumens erforderlich.

Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität des Albumins im Plasma und in den Lebermikrosomen kurz nach Injektion markierter Aminosäuren entspricht dem von Campbell (13), Gonzalez-Cadavid und Campbell (30), Majumdar und Mitarbeitern (57) und Peters (70) aufgefundenen. Die spezifische Aktivität-Zeit-Kurve in den Lebermikrosomen läßt drei Bereiche erkennen:

a) einen schnellen Anstieg
b) ein Maximum, das nach 10 bis 15 Minuten erreicht wird (vergl. 30), und

c) einen Abfall der spezifischen Aktivität, der wiederum zwei Phasen hat: eine schnelle Phase (bis ungefähr 60 Minuten), die Ausdruck der Albuminabgabe an das Blut ist, und eine langsam fallende Phase über Tage hinweg (Abb. 2 und 8).

Die Kurve des Plasmaalbumins besteht ebenfalls aus drei Bereichen:

a) einem im Vergleich zu den mikrosomalen Werten relativ langsamen Anstieg, der erst nach 10 bis 15 Minuten eindeutig meßbar wird,
b) einem Maximum, das erst nach 60 bis 70 Minuten erreicht wird (vergl. 57, 70) und für ungefähr zwei bis vier Stunden in Form eines Plateaus erhalten bleibt, und
c) einem Abfall der spezifischen Aktivität. Auch hier ist eine schnelle Phase (24 bis 48 Stunden) zu erkennen, die allmählich in eine langsame Phase übergeht.

Die spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven des Albumins in den Lebermikrosomen und im Plasma verhalten sich zueinander, wie man es im Dreikammer-System der Abbildung 80 erwarten kann. Die Synthese erfolgt an den Lebermikrosomen, von wo das Albumin in die extrazelluläre Flüssigkeit ausgeschleust wird. Es ist dabei noch nicht klar, ob das Albumin von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums direkt in die Außenflüssigkeit gelangt oder ob es erst in das Cytoplasma abgegeben wird, von wo es dann auf einem noch unbekannten Weg durch die Membranen hindurchtritt.

Aus den Untersuchungen von Greim (32) und Kuriyama und Mitarbeitern (54) läßt sich entnehmen, daß ein Gramm Rattenleber ungefähr 60 mg mikrosomales Protein enthält, das mit einer Halbwertzeit von zweieinhalb Tagen umgesetzt wird. Das Lebergewicht einer 100 Gramm schweren Ratte beträgt nach eigenen Messungen im Durchschnitt 5 Gramm. Das würde bedeuten, daß eine solche Leber 300 mg mikrosomales Protein enthält. Davon werden täglich bei einer Halbwertzeit von zweieinhalb Tagen 24 %, bzw. 72 mg umgesetzt.

Nach Untersuchungen von R.M. Campbell und Mitarbeitern (15) beträgt die Halbwertzeit des Plasmaalbumins 75 Stunden und der tägliche Umsatz ungefähr 21 %. Es ist sehr auffallend, daß das Plasmaalbumin mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit umgesetzt wird wie das mikrosomale Protein.

Die Konzentration des Plasmaalbumins beträgt 35 bis 40 mg/ml Plasma und das Plasmavolumen pro 100 Gramm Ratte ungefähr 4,5 bis 5 ml. Daraus ergibt sich eine Plasmaalbuminmenge von 160 bis 200 mg/100 g Körpergewicht. Matthews (60) bestimmte 180 mg/100 g Körpergewicht. 21 % von diesem intravasalen Albumin werden täglich umgesetzt; dies sind 38 mg/100 g Körpergewicht. Das entspricht auch den Untersuchungen von Wetterfors (94), der einen Umsatz von 31 mg/100 g Körpergewicht und Tag fand.

Das Albumin wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Vergleicht man die Menge an mikrosomalem Protein, die in der Leber gebildet wird (72 mg/100 g Körpergewicht und Tag), mit der synthetisierten Menge des Albumins (31 bis 38 mg/100 g Körpergewicht und Tag), so zeigt sich, daß die Leber mehr mikrosomales Protein als Albumin synthetisiert. Darüber hinaus werden noch Proteine synthetisiert, die nicht im endoplasmatischen Retikulum verbleiben, sondern ins Cytoplasma abgegeben werden. Dies bedeutet, daß die Albuminmenge, die an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums verbleibt, geringer ist als diejenige, welche die Leber in Form von Plasmaalbumin (zur Abgabe bestimmtes Albumin) abgibt.

Es ist auffallend, daß die maximale spezifische Aktivität des mikrosomalen Albumins von 2 500 bis 3 000 Ipm nach zwei Stunden bereits auf 850 Ipm abgesunken und nach fünf bis sechs Stunden die spezifische Aktivität des Albumins im Plasma nahezu erreicht ist. Dieses Verhalten kann nicht mit den üblichen Vorstellungen (94), daß kontinuierlich neugebildetes Albumin von der Leber in das Blutplasma übertritt, und den Versuchen von Campbell (12) in Einklang gebracht werden. Campbell fand in seinen Versuchen, daß drei Minuten nach Gabe einer markierten Aminosäure gerade die höchste spezifische Aktivität in dem

von den Membranen schwer abzulösenden Albumin vorliegt. Seine Untersuchungen ergaben:

1) im Albumin des Zellsaftes keine Radioaktivität
2) im Beschallungsalbumin eine spezifische Aktivität von 481 Ipm/mg Albumin
3) im Desoxycholatalbumin eine spezifische Aktivität von 823 Ipm/mg Albumin.

Eindeutigere Daten sind sicherlich zu gewinnen, wenn man markiertes Albumin in die Blutbahn injiziert und sein eventuelles Auftreten in der Leber nachweist. Eine weitere Versuchsanordnung würde darin bestehen, kontinuierlich die markierten Aminosäuren zu applizieren.

Die Phenobarbitalwirkung

Nach einmaliger Gabe von Phenobarbital ist die Syntheserate des mikrosomalen Albumins bis zu zehn Stunden nach der Injektion deutlich erhöht und wie die entsprechenden Abbildungen (3, 4 und 5) zeigen, wird auch gleichzeitig mehr Albumin in das Blut abgegeben; sonst wären die höheren spezifischen Aktivitäten des Plasmaalbumins nicht zu erklären. Aber bereits 18 bis 20 Stunden nach der ersten Phenobarbitalgabe haben sich die Werte der spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven nach einem Kurzzeiteinbau nahezu ausgeglichen. Das gilt für das Albumin der Mikrosomen wie des Plasmas. Im Versuch, der auf Abbildung 5 dargestellt ist, kommt es ebenfalls zu einem solchen Umschlag nach 20 Stunden. Diese Ergebnisse lassen zwei Interpretationen zu. Entweder ist die Albuminsynthese noch gesteigert, oder es ist bereits (nach 20 Stunden) mehr Albumin gebildet und dadurch die spezifische Aktivität stark verdünnt.

Wenn die Tiere mehrmals Phenobarbitalgaben erhalten, liegen die Werte der spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven der phenobarbitalbehandelten Ratten stets unter den Kontrollen. Sehr deutlich ist dieses Verhalten nach einer achttägigen Behandlung. Wieder verhält sich das Albumin der Mikrosomen und das des Plasmas gleich. Das mikrosomale Protein hat ein entsprechendes Verhalten.

Auch hier tritt die Frage auf, ob eine verminderte Synthese oder eine Verdünnung der Aktivität vorliegt. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß sich die Leber unter Phenobarbital um 5 %/Tag vergrößert, bis nach einer Behandlungsdauer von fünf bis sieben Tagen ein "steady state" erreicht wird, was einer minimal erreichbaren Lebergewichtszunahme von 30 % entspricht.

Greim (32) hat an Hand genauer Messungen der Cytochrom-P-450-Konzentration nach sechsmaliger Phenobarbitalgabe eine Erhöhung des mikrosomalen Proteingehaltes von 64,8 mg auf 83 mg (28 %) in einem Gramm Leber feststellen können. Berücksichtigt man, daß die Leber sich insgesamt um 30 bis 40 % vergrößert hat, ergäbe sich daraus eine Gesamterhöhung des mikrosomalen Proteingehaltes der Leber bei phenobarbitalbehandelten Tieren von 84 bis 112 %. Setzt man voraus, daß die vergrößerte Leber die gleiche Menge an markierten Aminosäuren enthält, und nimmt man weiter an, daß das Albumin der mikrosomalen Membranen proportional mit dem Gesamtproteingehalt der Leber anwächst, dann würde sich die spezifische Aktivität erheblich verdünnen. Deswegen war es zweckmäßig, die nach Phenobarbitalbehandlung gemessenen spezifischen Aktivitäten auf den vermutlichen Gesamtalbuminbestand der Leber zu beziehen, um so die Verdünnung der Aktivität zu korrigieren. Diese Korrektur kann auf Grund des oben Gesagten nur unvollständig sein. Solange der tatsächliche Albumingehalt der Mikrosomen nicht genau bekannt ist, muß auf eine vollständige Korrektur verzichtet werden. Es wurde nur der Anstieg des Lebergewichts berücksichtigt. Diese Korrektur allein genügt schon, um zu zeigen, daß die spezifische Aktivität nach der Behandlung stets höher liegt. Das Verhältnis zwischen Kontrollen und behandelten Tieren wird vertauscht, so daß nach Phenobarbital die spezifische Aktivität des mikrosomalen Proteins um 20 % und die des mikrosomalen Albumins um 18 bis 30 % ansteigt (Tab. X). Andere Autoren haben eine ähnliche Erhöhung des Proteingehalts nach Phenobarbital finden können (5, 53, 84, 87). Die Werte der spezifischen Aktivität des Plasmaalbumins (Abb. 6

und 10) liegen ebenfalls bereits nach der zweiten, bzw. dritten Phenobarbitalgabe stets unterhalb der Kontrollen. Aber auch in diesem Fall wäre eine Korrektur auf den Anstieg des Albumingehalts nötig. Eine solche Korrektur ist allerdings problematisch, da nur die Konzentration des Albumins, nicht aber die tatsächliche Gesamtmenge genau bekannt ist. Jedenfalls zeigen diese Versuche, daß eine Verdünnung (10 bis 15 %) auftritt. Wenn man annimmt, wie oben diskutiert, daß die an den Mikrosomen synthetisierte Albuminmenge nach Phenobarbitalbehandlung wahrscheinlich vermehrt ist, wenn auch die spezifischen Aktivitäten stets niedriger liegen, dann sind die verminderten spezifischen Aktivitäten des Albumins im Plasma 60 Minuten nach Injektion der markierten Aminosäuren (Abb. 10) auch als Zeichen einer erheblichen Verdünnung anzusehen. Offenbar hat sich die Albuminmenge im Blut stärker vermehrt als es aus dem Konzentrationsanstieg hervorgeht (Tab. VIII).

Daß die Interpretation dieser Versuche offensichtlich richtig ist, wird durch den letzten Versuch weiter bestätigt. Nach Absetzen einer längeren Phenobarbitalbehandlung sind zunächst, wie zu erwarten, die spezifischen Aktivitäten der behandelten Tiere erniedrigt. Schon innerhalb von 24 Stunden gleichen sich die Phenobarbitaltiere den Kontrollen an. Die Lebergewichte haben ein zeitlich paralleles Verhalten, d.h., nach Absetzen von Phenobarbital nehmen sie schnell ab. Das könnte der Grund dafür sein, daß die zunächst erniedrigten spezifischen Aktivitäten des Albumins im Plasma der behandelten Tiere schnell ansteigen.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nur spezifische Aktivitäten gemessen wurden, lassen sich doch aus dem Verlauf der spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven folgende Schlüsse ziehen:

1) Ein schneller Austausch des Albumins zwischen Leber und Plasma, der etwa nach fünf bis sechs Stunden beendet ist. Offensichtlich dauert der Austausch mit der interstitiellen Flüssigkeit mindestens 30 Stunden (Campbell und Mitarbeiter (15)).

2) Phenobarbital erhöht nicht nur die Synthese von verschiedenen mikrosomalen Enzymen, sondern auch von Albumin. In den ersten zehn Stunden nach Phenobarbital stellt sich die gesteigerte Synthese als eine tatsächliche Erhöhung der spezifischen Aktivität dar. Etwa 20 Stunden nach der ersten Phenobarbitalgabe tritt eine Verminderung der spezifischen Aktivität ein, bedingt durch die beginnende Verdünnung (vermehrtes Protein). Nach Abbruch der Behandlung steigt die spezifische Aktivität wieder zur Norm (durch eine Verkleinerung der Leber).
3) Nach einer längeren Phenobarbitalbehandlung sind die Werte der spezifischen Aktivität von Plasmaalbumin bei phenobarbitalbehandelten Tieren ein und zwei Stunden nach ^{14}C-Proteinhydrolysat deutlich erniedrigt, was wahrscheinlich auf eine Verdünnung zurückzuführen ist. Die Phenobarbitalwerte liegen in den ersten zwei Stunden niedriger als die Kontrollwerte. Danach aber werden die spezifischen Aktivitäten der behandelten Tiere höher als die der Kontrollen. Dieses Verhalten ist schwer zu interpretieren. Der Abfall der spezifischen Aktivität-Zeit-Kurven scheint mit der gleichen Geschwindigkeit bei Phenobarbitaltieren und Kontrollen zu erfolgen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Abfall in den ersten 20 Stunden hauptsächlich auf einem Austausch des markierten Albumins mit dem Albumin der interstitiellen Flüssigkeit beruht. Es könnte sein, daß nicht nur dieser Austausch unter Phenobarbital verzögert ist, sondern auch, daß Albumin vermehrt in das Blutplasma abgegeben wird, wodurch die spezifische Aktivität-Zeit-Kurve bei den behandelten Tieren höher liegen würde.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen ergab die Arbeit folgende Befunde:

1) Die beiden verwendeten Isolierungsmethoden des Albumins ergeben elektrophoretisch gleiche Fraktionen.

2) Das radioaktiv markierte Albumin der Lebermikrosomen und des Plasmas sind korreliert.

3) In der Zeitspanne von 20 bis 25 Stunden nach Phenobarbital tritt in Folge der Synthesesteigerung eine Vermehrung des Albumingehaltes im Blut auf. Die spezifische Aktivität des mikrosomalen und plasmatischen Albumins gleicht sich innerhalb von vier bis sechs Stunden an.

4) Bei einmaliger Phenobarbitalgabe tritt schon nach fünf Stunden eine erhöhte Albuminsynthese auf.

5) Bei mehrmaliger Phenobarbitalgabe erreicht die gesteigerte Albuminsynthese nach vier bis fünf Tagen ihren Höhepunkt und hält so lange an wie die Behandlung dauert.

6) Nach Absetzen von Phenobarbital normalisieren sich die Werte innerhalb von vier bis fünf Tagen.

7) Die biologische Halbwertzeit des Albumins scheint bei behandelten und unbehandelten Tieren gleich zu sein.

8) Es besteht eine Parallelität zwischen dem Verhalten der mikrosomalen Proteine und des Albumins.

ABKÜRZUNGEN IN DEN TABELLEN

Alb.	Albumingehalt des Plasmas in mg/ml Plasma
As. Pool	Aktivität im eiweißfreien Cytosol der Leberzelle
G.A.P.	Gesamte Aktivität des Plasmas in Ipm/ml Plasma
K.G.	Rattenkörpergewicht in Gramm
L.G.	Lebergewicht in Gramm
Prot.	Proteingehalt des Plasmas in mg/ml Plasma
s.A.m.A.	Spezifische Aktivität des mikrosomalen Albumins in Ipm/mg Albumin
s.A.m.P.	Spezifische Aktivität des mikrosomalen Proteins in Ipm/mg Protein
s.A.P.A.	Spezifische Aktivität des Plasmaalbumins in Ipm/mg Albumin
Z.n.^{14}C in Min. ..	Zeit nach ^{14}C-Proteinhydrolysat-Injektion in Minuten
Z.n.^{14}C in Std. ..	Dasselbe in Stunden
Z.n.Pb.in Std. ...	Zeit nach Phenobarbital in Stunden
Z.n.l.Pb.in Std. .	Zeit nach letzter Phenobarbitalgabe in Stunden
$\bar{x}$	Mittelwert
$\pm$ s	Streuung der Einzelwerte
$\pm$ $s_{\bar{x}}$	Streuung des Mittelwerts
$\Phi(t)$	Zuverlässigkeit des 10 %igen Toleranzbereichs des Mittelwerts $\bar{x}$

Tabelle I

	i.p. Injektion		i.v. Injektion	
	s.A.m.A.	s.A.P.A.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
1	2 504	568	2 890	878
2	2 900	770	3 010	790
3	2 418	878	3 400	830
4	3 090	590	2 860	890
5	2 400	630	3 205	900
6	3 380	695	3 190	856
$\bar{x}$	2 782	688	3 092	857
$\pm s$	406	118	209	41,4
$\pm s\%$	14	17	6	4

Schlachtung 60 Minuten nach ^{14}C-Proteinhydrolysat (10 µCi)
Körpergewicht: 100 bis 105 Gramm

Tabelle II

A. Mit 10 µCi ^{14}C-Proteinhydrolysat (i.p.)

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Min.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
118	6,3	4	585	0
120	6,0	6	4 800	98
110	5,3	15	6 220	171
114	6,1	25	5 362	234
115	6,0	40	3 880	320
110	5,2	50	3 040	413
113	5,5	70	1 900	515
123	6,0	90	1 336	500

B. Mit 5 µCi ^{14}C-Proteinhydrolysat (i.p.)

105	5,1	4	550	0
110	5,2	10	1 200	75
113	5,2	15	2 600	--
108	5,5	30	1 250	180
105	5,0	60	1 000	400
115	5,4	90	680	450

Tabelle II (Forts.)

C. Abfall der spezifischen Aktivität mit 10 µCi (i.p.)

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Std.	s.A.P.A.
110	5,5	3	510
114	5,8	6	476
109	5,3	24	441
120	6,0	48	337
117	5,8	74	296
121	5,7	100	283

Tabelle III

	10 Minuten nach ^{14}C		30 Minuten nach ^{14}C		60 Minuten nach ^{14}C	
	s.A.m.A.	s.A.P.A.	s.A.m.A.	s.A.P.A.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
1	2 400	90	1 180	300	1 200	630
2	2 250	85	1 560	270	1 080	670
3	2 360	59	1 680	250	1 280	617
4	2 100	70	1 510	268	1 179	705
5	2 374	55	1 240	287	1 308	655
6	2 480	80	1 550	290	1 264	610
$\bar{x}$	2 327	73	1 453	277	1 218	647
$\pm s$	134,0	14,2	198,0	18,3	85,0	36,0
$\pm s\%$	5	19	13,5	6,5	7	5,5
$\pm s_{\bar{x}}$	54,6	5,8	80,8	7,5	34,7	14,7
$\Phi(t)$	99,9%	89,2%	93,2%	84,1%	99,4%	99,9%

Nicht behandelte Tiere; Körpergewicht: 100 ± 3 Gramm; Lebergewicht: 5,2 ± 0,4 Gramm
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

Tabelle IV

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Min.	Alb.	Prot.	G.A.P.	As.Pool	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
KONTROLLEN									
116	6,6	5	37,4	66,8	47 450	147 867	375	1 480	74
113	6,3	10	36,0	64,6	25 500	88 964	721	2 330	70
112	6,5	30	38,0	66,0	21 750	29 248	575	1 650	337
111	5,4	60	36,4	66,8	28 940	21 900	510	1 080	648
110	5,5	90	42,0	81,4	36 250	18 056	503	957	664
1 x PHENOBARBITAL (7 bis 8 Stunden danach)									
105	5,0	5	40,0	77,4	44 670	119 748	637	1 770	80
114	5,4	10	36,0	62,6	23 700	87 576	1 068	2 676	48
108	4,8	15	40,0	76,0	21 550	67 340	1 009	2 551	99
106	4,9	30	37,4	64,0	26 000	46 204	815	2 012	441
107	5,5	60	36,0	62,0	28 470	22 956	652	1 252	731
110	4,7	90	40,0	77,4	34 580	19 832	578	1 221	688

^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

Tabelle V

KONTROLLEN

Die gleichen wie in Tabelle IV

1 x PHENOBARBITAL (18 bis 19 Stunden danach)

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Min.	Alb.	Prot.	G.A.P.	As.Pool	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
110	6,1	5	40,0	73,4	50 950	104 256	579	1 624	70
109	6,7	10	38,6	69,4	27 740	69 544	850	2 550	50
108	6,3	15	35,4	60,0	22 400	60 448	717	--	94
97	5,2	30	37,4	64,0	25 250	42 752	650	1 780	348
111	6,1	60	38,6	71,4	32 850	26 828	570	1 250	642
114	6,9	90	38,0	67,0	34 450	16 980	514	1 128	680

^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.V.

Tabelle VI

L.G.	Z.n.Pb in Std.	Z.n. ^{14}C in Min.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
4,6	Kontr.	10	2 191 ± 185	---
4,3	Kontr.	60	1 363 ± 160	415 ± 38
4,8	5	10	3 250	---
4,3	5	60	1 728	597
4,5	10	10	3 726	---
4,8	10	60	1 681	512
5,0	20	10	2 550	---
5,3	20	60	1 336	185
4,6	30	10	2 150	---
4,8	30	60	1 971	172
5,3	40	10	2 510	---
4,9	40	60	1 625	250

Einmalige Phenobarbitalgabe
Körpergewicht: 100 ± 5 Gramm
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.
Kontrollen: Mittelwert von 5 Ratten

Tabelle VII

L.G.	Z.n. ^{14}C in Min.	G.A.P.	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.P.P.
KONTROLLEN					
5,1	5	25 874	120	550	65
5,2	10	19 483	232	1 200	70
5,0	15	20 942	394	2 080	79
5,2	25	15 420	539	---	165
5,5	35	17 204	442	1 050	215
5,5	60	18 615	423	1 030	350
4,9	90	17 664	400	800	426
5,4	120	21 310	262	610	356
PHENOBARBITAL (3 x)					
6,6	5	18 855	102	506	20
6,5	10	23 875	217	853	60
7,4	15	23 095	255	1 200	76
6,8	25	18 325	340	1 350	98
6,2	35	19 030	288	842	179
6,6	60	22 818	265	880	306
5,9	90	27 633	200	760	360
7,1	120	22 445	192	600	343

Körpergewicht: 105 ± 5 Gramm
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.

Tabelle VIII

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Min.	Alb.	Prot.	G.A.P.	As.Pool	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
KONTROLLEN									
121	6,2	5	31,2	70,0	48 350	159 932	331	1 578	96
109	5,5	10	31,2	70,0	32 100	105 676	643	2 820	99
129	7,0	15	31,4	68,0	19 100	65 856	793	2 606	125
116	6,1	30	31,4	63,4	22 623	26 672	657	1 600	207
119	6,0	60	31,2	61,4	25 500	25 100	639	1 212	605
108	4,8	120	31,2	66,8	26 700	15 984	366	849	620
8 x PHENOBARBITAL ("steady state")									
102	7,3	5	33,4	76,8	65 100	199 676	327	1 353	117
107	7,0	10	32,0	68,8	27 050	100 516	588	1 790	90
107	7,8	15	32,0	75,4	20 700	70 032	649	2 252	118
108	7,6	30	32,6	78,8	22 577	37 788	608	1 437	175
112	8,3	60	36,0	71,4	25 505	19 156	568	1 170	450
109	7,0	120	36,0	72,0	28 419	16 132	349	888	564

^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

Tabelle IX

K.G.	L.G.	Z.n. ^{14}C in Std.	Alb.	Prot.	G.A.P.	As.Pool	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.P.A.
KONTROLLEN									
108	4,9	2	31,2	66,8	26 700	15 984	366	849	620
119	6,3	6	26,6	61,4	23 800	5 632	360	605	556
111	5,3	20	34,6	76,0	22 317	4 368	321	580	360
111	5,0	27	29,2	68,8	19 714	3 092	317	492	293
112	5,0	48	33,4	60,0	15 250	1 876	299	500	258
118	6,0	72	34,6	76,8	12 000	1 380	297	504	250
PHENOBARBITAL ("steady state"-Abfallkurve)									
109	7,0	2	36,0	72	28 419	16 132	349	888	564
120	7,2	6	38,6	70	27 750	5 040	333	628	707
122	7,8	20	37,4	72	20 378	2 053	311	515	434
113	7,2	27	30,8	80	18 800	2 404	278	441	410
115	7,3	48	33,4	77	14 500	1 592	273	447	310
114	7,6	72	38,6	79	14 411	1 236	241	445	292

^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.v.

Tabelle X

a) aus Tabelle VIII

Kontrollen (L.G.$\bar{x}$ = 5,9 g)		Phenobarbital (L.G.$\bar{x}$ = 7,5 g)	
s.A.m.A.	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.m.P.
9 310	1 952	10 147	2 452
16 638	3 793	13 425	4 410
15 375	4 678	16 890	4 867
9 440	3 876	10 777	4 560
7 150	3 770	8 775	4 267
5 009	2 159	6 660	2 617

b) aus Tabelle IX

Kontrollen (L.G.$\bar{x}$ = 5,4 g)		Phenobarbital (L.G.$\bar{x}$ = 7,4 g)	
s.A.m.A.	s.A.m.P.	s.A.m.A.	s.A.m.P.
4 584	1 976	6 571	2 582
3 267	1 944	4 647	2 464
3 132	1 733	3 811	2 301
2 656	1 711	3 263	2 057
2 700	1 614	3 307	2 020
2 721	1 603	3 293	1 783

Die spezifischen Aktivitäten des mikrosomalen Proteins und Albumins wurden mit dem Mittelwert der Lebergewichte der jeweiligen Gruppe multipliziert.

Tabelle XI

	K O N T R O L L E N		P H E N O B A R B I T A L	
Z.n.Pb in Std.	L.G.	s.A.P.A.	L.G.	s.A.P.A.
13	4,4	412 ± 45	4,9	552 ± 42
38	4,4	438 ± 20	5,6	290 ± 42
60	4,8	455 ± 48	5,9	340 ± 26
110	5,9	443 ± 29	8,1	254 ± 22
158	6,9	440 ± 39	9,3	315 ± 36
230	6,5	419 ± 45	9,2	347 ± 23

Phenobarbital: einmal täglich während 10 Tagen
Körpergewicht: 130 bis 155 Gramm (Wachstum!)
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.
Mittelwert von drei Ratten

Tabelle XII

	KONTROLLEN		PHENOBARBITAL	
Z.n.l.Pb. in Std.	L.G.	s.A.P.A.	L.G.	s.A.P.A.
13	4,6	425 ± 38	5,8	350 ± 15
38	4,3	444 ± 41	5,8	456 ± 46
96	4,5	444 ± 27	4,4	500 ± 38
158	4,5	431 ± 33	4,4	483 ± 49
252	5,2	463 ± 45	4,8	495 ± 43
372	5,1	456 ± 41	4,8	460 ± 36

5 x Phenobarbital, danach Abbruch der Behandlung
Körpergewicht: 125 ± 10 Gramm
^{14}C-Proteinhydrolysat: 5 µCi, i.p.
Mittelwert von drei Ratten

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDOU, J.A. and H. TARVER: Plasma Protein
J. biol. Chem. 190, 796 (1951)

2. ABDOU, J.A. and H. TARVER: Plasma Protein
J. biol. Chem. 190, 781 (1951)

3. ALTANER, C., A. MADARIC and F. SVEC: The effect of the hydrazide of podophyllic acid (SP I Sandoz) on the proteosynthesis of normal and tumor tissues in vivo.
Biochem. Pharmacol. 15, 2073 (1966)

4. ANTON, A.H.: The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy.
J. Pharmac. exp. Ther. 129, 282 (1960)

5. ARGYRIS, T.S.: Liver growth associated with the induction of aminopyrine demethylase activity after phenobarbital treatment in adult male rats.
J. Pharmacol. 164, 405 (1968)

6. BALFOUR, W.E. and H.E. TUNNICLIFFE: Thyroxine binding by serum proteins.
J. Physiol. 153, 179 (1960)

7. BARKER, E.A., E.A. SMUCKLER and E.P. BENDITT: Effects of tioacetamide and yellow phosphorus poisoning on protein synthesis in vivo.
Lab. Invest. 12, 955 (1963)

8. BENNHOLD, H.: Über die Vehikelfunktion der Serumeiweißkörper.
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 42, 273 (1932)

9. BHUYAN, B.K.: Pactamycin an antibiotic that inhibits protein synthesis.
Biochem. Pharmacol. 16, 1411 (1967)

10. BORSOOK, H., C.L. DEASY, A.J. HAAGENSMIT, G. KEIGHLEY and P.H. LOWY: Incorporation of ^{14}C-labeled amino acids into proteins of fractions of guinea pig liver homogenat.
Fed. Proc. 9, 154 (1950)

11. BRAUN, G.A., J.B. MARSH and D.J. DRABSKIN: Synthesis of plasma albumin and tissue proteins in regenerating liver.
Metabolism 11, 957 (1962)

12. CAMPBELL, P.N.: The synthesis of serum albumin by the microsome fraction of the liver.
In Protein Biosynthesis, p. 19, ed. by
New York: Academic Press 1961

13. CAMPBELL, P.N.: The correlation between morphology and protein synthesizing activity in liver.
Acta Biol. Med. Germ. 19, 621 (1967)

14. CAMPBELL, P.N., C. COOPER and M. HICKS: Studies on the morphological constituents of the microsome fraction from rat liver in protein synthesis.
Biochem. J. 92, 225 (1964)

15. CAMPBELL, R.M., O.P. CUTHBERTSON, C.M. MATTHEWS and A.S. Mc FARLANE: Behavior of ^{14}C- and ^{131}I-labeled plasma proteins in the rat.
Int. J. Appl. Ras. Isot. 1, 66 (1956)

16. CAMPBELL, P.N., O. GREENGARD and B.A. KERNOT: Amino acid incorporation into serum albumin in microsome preparations from regenerating rat liver.
Biochem. J. 68, 18p (1958)

17. CAMPBELL, P.N., O. GREENGARD and B.A. KERNOT: Studies on the synthesis of serum albumin by the isolated microsome fraction from rat liver.
Biochem. J. 74, 107 (1960)

18. CAMPBELL, P.N. and B.A. KERNOT: The incorporation of ^{14}C-Leucine into serum albumin by the isolated microsome fraction from rat liver.
Biochem. J. 82, 262 (1962)

19. CAMPBELL, P.N., E. LOWE and G. SERCK-HANSSEN: Protein synthesis by microsomal particles from regenerating rat liver.
Biochem. J. 103, 280 (1967)

20. CAMPBELL, P.N. and J.R. SARGENT: Techniques in protein biosynthesis.
London, New York: Academic Press 1966

21. CLAUSEN, J.: Binding of sulfonamides to serum proteins: Physicochemical and immunochemical studies. J. Pharmac. exp. Ther. 153, 167 (1966)

22. CONNEY, A.H.: Pharmacological implication of microsomal inductions. Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)

23. CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL and J.J. BURNS: Adaptive increase in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. J. Pharmac. exp. Ther. 130, 1 (1960)

24. DALGLIESH, C.E.: Time factors in protein biosynthesis. Science 125, 271 (1957)

25. DARKEN, M.A.: Puromycin inhibition of protein synthesis. Pharmacol. Rev. 16, 223 (1964)

26. DEBRO, J.R., H. TARVER and A. KORNER: The determination of serum albumin and globulin by a new method. J. Lab. Cli. Med. 50, 728 (1957)

27. FARBER, E. and M.S. CORBAN: Sex differences in ethionine inhibition of hepatic protein synthesis. J. biol. Chem. 233, 625 (1958)

28. FOUTS, R.J. and L.A. ROGERS: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. J. Pharmac. exp. Ther. 147, 112 (1965)

29. GELBOIN, H.V. and L. SOKOLOFF: Effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on amino acid incorporation in protein. Science 134, 611 (1961)

30. GONZALEZ-CADAVID, N.F. and P.N. CAMPBELL: The biosynthesis of cytochrome c: Sequence of incorporation in vivo of ^{14}C-Lysine into cytochrome c and total protein of rat liver subcellular fractions. Biochem. J. 105, 443 (1967)

31. GREIM, H.: Steigerung der zellfreien Proteinsynthese durch Phenobarbitalbehandlung hungernder Ratten. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1774 (1968)

32. GREIM, H.: Synthesesteigerung und Abbauhemmung des arzneimittelabbauenden Enzymsystems durch Phenobarbital. Habilitationsschrift, Tübingen 1970

33. GOLDBAUM, L.R. and P.K. SMITH: The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions. J. Pharmac. exp. Ther. 111, 197 (1954)

34. GOLDSTEIN, A.: The interaction of drugs and plasma proteins. Pharmacol. Rev. 1, 102 (1949)

35. HAGEMANN, E.: Ratte und Maus Walter de Gruyter & Co. Berlin 1960

36. HULTIN, T.: Incorporation in vivo of ^{15}N-labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks. Exp. Cell. Res. 1, 376 (1950)

37. JICK, H. and L. SHUSTER: The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphatecytochrome c reduced in the livers of mice treated with phenobarbital. J. biol. Chem. 241, 5366 (1966)

38. JONDORF, W.R.: Further studies with glutarimide antibiotics II. Some effects of cyclohexamide pretreatment on hepatic protein synthesis and release of nascent polypeptides in intact and adrenalectomized rats. Biochem. Pharmacol. 17, 839 (1968)

39. JONDORF, W.R. and G. GRUNBERGER: Comparison of cyclohexamide effect on hepatic protein synthesis at the microsomal level in vivo and in vitro. Biochem. Pharmacol. 16, 2055 (1967)

40. JONDORF, W.R., D.C. SIMON and M. AVNIMELECH: The stimulation of amino acid incorporation in a mammalian system with phenobarbital, 3-methylcholanthrene and cyclohexemide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 644 (1966)

41. JUCHAU, M.R. and J.R. FOUTS: A comparison of assays for the analysis of protein content of liver homogenate subfractions.
Biochem. Pharmacol. 16, 155 (1967)

42. JUNGBLUT, P.W. und F. TURBA: Vergleich von Darstellungsverfahren für Ratten-Serumalbumin und Charakterisierung eines reinen Präparats.
Biochem. Zeitschrift 337, 88 (1963)

43. JUNGBLUT, P.W. und F. TURBA: Proteinsynthese in Lebermikrosomen.
In "Dynamik des Eiweißes", 10. Colloquium der Ges. für Physiol. Chem., Mosbach (1959), S. 102
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960

44. KATO, R., W.R. JONDORF, L.A. LOEB, T. BEN and H.V. GELBOIN: Studies on the mechanism of drug-induced microsomal enzyme activities.
Mol. Pharmacol. 2, 171 (1966)

45. KATO, R., L.A. LOEB, H.V. GELBOIN: Microsome specific stimulation by phenobarbital of amino acid incorporation in vivo.
Biochem. Pharmacol. 14, 1164 (1965)

46. KATZ, J., G. BONORRIS and A.L. SELLERS: Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats.
J. Lab. Clin. Med. 62, 910 (1963)

47. KATZ, J., A.L. SELLERS and G. BONORRIS: Plasma albumin synthesis in perfused rat liver.
In: "Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber" von Staib und Scholz, Springer Verlag 1968

48. KATZ, J., S. ROSENFELD and A.L. SELLERS: Site of plasma albumin catabolism in the rat.
Amer. J. Physiol. 200, 1301 (1961)

49. KEEN, P.M.: The binding of penicillins to bovine serum albumin.
Biochem. Pharmacol. 15, 447 (1966)

50. KENNEY, F.T.: Induction of tyrosine-α-ketoglutarate transaminase in rat liver.
J. biol. Chem. 237, 3495 (1962)

51. KOBLET, H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964

52. KRÖNER, H., B. GUTENBERGER, S. HOLLMANN und W. STAIB: Akute Barbitalwirkung auf den Protein- und Nukleinstoffwechsel der Rattenleber.
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 1, 8 (1969)

53. KUNZ, W., G. SCHAUDE, W. SCHMID and M. SIESS: Stimulation of liver growth by drugs. I. Morphological analysis.
Excerpta Med. Int. Cong. Ser. 115, Rome-Meeting, Jan. 1966, p. 113

54. KURIYAMA, Y., T. OMURA, P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation of the protein components of rat liver microsomal membranes.
J. biol. Chem. 244, 2017 (1969)

55. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.C. FARR and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenoreagent.
J. biol. Chem. 193, 265 (1951)

56. MAGEE, P.N.: Toxic liver injury. Inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem. J. 70, 606 (1958)

57. MAJUMDAR, C., K. TSUKUDA and I. LIEBERMAN: Liver protein synthesis after partial hepatectomy and acute stress.
J. biol. Chem. 242, 700 (1967)

58. MANS, R.J. and G.D. NOVELLI: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter paper disk method.
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48 (1961)

59. MARSH, J.B., D.L. DRABKIN, G.A. BRAUN and J.S. PARKS: Factors in the stimulation of protein synthesis by subcellular preparations from rat liver.
J. biol. Chem. 241, 4168 (1966)

60. MATTHEWS, C.M.: The Theory of tracer experiments with ^{131}I-labeled plasma proteins.
Phys. in Med. Biol. 2, 36 (1957)

61. MAURER, W.: Die Größe des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiß.
In "Dynamik des Eiweißes", 10. Colloquium der Ges. für Physiol. Chem., Mosbach (1959) S. 1, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960

62. Mc FARLANE, A.S., L. IRONS, A. KOJ and E. REGOECZI: The measurement of synthesis rates of albumin and fibrinogen in rabbits.
Biochem. J. 95, 536 (1965)

63. Mc FARLANE, A.S.: Measurement of synthesis rates of liver produced plasma proteins.
Biochem. J. 89, 277 (1963)

64. MITINA, L.V.: The effect of aminazine on the protein metabolism.
Farmakol. i. Toxikol. 20, 75 (1957)

65. ORRENIUS, S. and L. ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylation enzymes of rat liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 60 (1964)

66. PALADE, G.E. and P. SIEKEVITZ: Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study.
J. biophys. biochem. Cytol. 2, 171 (1956)

67. PETERS, T.: Evidence of intermediate compounds in serum albumin synthesis.
J. biol. Chem. 200, 461 (1953)

68. PETERS, T.: A serum albumin precursor in cytoplasmic particles.
J. biol. Chem. 229, 659 (1957)

69. PETERS, T.: The biosanthesis of rat serum albumin. I. Properties of rat albumin and its occurrence in liver fractions.
J. biol. Chem. 237, 1181 (1962)

70. PETERS, T.: The biosynthesis of rat serum albumin. II. Intracellular phenomena in the secretion of newly formed albumin.
J. biol. Chem. 237, 1186 (1962)

71. PUTNAM, F.W.: Structure and functions of the plasma proteins.
The Proteins. Vol. II, Neurath ed., New York: Academic Press (1964) p. 153

72. RATNER, M. and D.H. CLOUET: The effect of morphine on ^{14}C-leucine incorporation by rat liver microsomes in vitro.
Biochem. Pharmacol. 13, 1655 (1964)

73. REEVE, E.B., J.R. PEARSON and D.C. MARTZ: Plasma protein synthesis in the liver: Method for measurement of albumin formation in vivo.
Science 139, 914 (1963)

74. REMMER, H.: Die Beschleunigung des Evipanabbaues unter der Wirkung von Phenobarbital.
Naturwiss. 45, 189 (1958)

75. REMMER, H.: Die Beschleunigung der Evipanoxidation und der Demethylierung von Methylaminoantipirin durch Barbiturate.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 237, 296 (1959)

76. REMMER, H.: Drugs as activators of drug enzymes.
Proc. of the I. Internat. Pharmacol. Meeting. Vol. VI p. 235 (1962)

77. REMMER, H., H. GREIM, J.B. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK: Methods for the elevation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrome p-450.
Methods in Enzymol. X, p. 703 (1967)

78. REMMER, H. und H.J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital.
Klin. Wschr. 41, 276 (1963)

79. REMMER, H. und H.J. MERKER: Vermehrung von "smooth"-Membranen und arzneimittelabbauende Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen bei der Behandlung mit verschiedenen Pharmaka.
Naturwiss. 50, 670 (1963)

80. REMMER, H. und M. SIEGERT: Kumulation und Elimination von Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 243, 479 (1962)

81. SAN PIETRO, A. and D. RITTENBERG: A study of the rate of protein synthesis in human. II. Measurement of the metabolic pool and the rate of protein synthesis.
J. biol. Chem. 201, 457 (1953)

82. SCHIMKE, R.T.: The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver.
J. biol. Chem. 239, 3808 (1964)

83. SCHIMKE, R.T., E.W. SWEENEY and C.M. BERLIN: The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase.
J. biol. Chem. 240, 322 (1965)

84. SCHLICHT, I., W. KORANSKY, S. MAGOUR und R. SCHULTE-HERMANN: Größe und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 261, 26 (1968)

85. SEIFERT, J., H. GREIM und P. CHANDRA: Die Wirkung von Phenobarbital auf die Ribosomenfraktionen der Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1179 (1968)

86. SHUSTER, L. and R.V. HANNAM: The indirect inhibition of protein synthesis in vivo by chlorpromazine.
J. biol. Chem. 239, 3401 (1964)

87. SHUSTER, L. and H. JICK: The turnover of microsomal protein in the livers of phenobarbital treated mice.
J. biol. Chem. 241, 5361 (1966)

88. SMUCKLER, E.A., O.A. ISERI and E.P. BENDITT: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride.
J. exp. Med. 116, 55 (1962)

89. SWICK, R.W.: Measurement of protein turnover in rat liver.
J. biol. Chem. 231, 751 (1958)

90. TAKAGI, M. and K. OGATA: Direct evidence for albumin biosynthesis by membrane bound polysomes in rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 33, 55 (1968)

91. VILLA-TREVINO, S. and E. FARBER: The reversal by adenosine triphosphate of ethionine induced inhibition of protein synthesis.
Biochem. Biophys. Acta 61, 649 (1962)

92. VILLA-TREVINO, S. and D.D. LEAVI: Effects of the hepatotoxic agents retrosine and aflatoxin B on hepatic protein synthesis in the rat.
Biochem. J. 109, 87 (1968)

93. WEISS, W.P., P.L. CAMPBELL, G.E. DEIBLER and L. SOKOLOFF: Effect of salicylate on amino acid incorporation into protein.
J. Pharmac. exp. Ther. 136, 366 (1962)

94. WETTERFORS, J.: Albumin.
Acta med. Scand. Suppl. 430 (1965)

95. WILSON, J.T. and J.R. FOUTS: The effect of chronic phenobarbital administration on some hepatic drug-metabolizing enzyme activities.
Biochem. Pharmacol. 15, 1238 (1966)

96. WILSON, S.H., H.Z. HILL and M.B. HOAGLAND: Physiology of rat liver polysomes. Protein synthesis by stable polysomes.
Biochem. J. 103, 567 (1967)

L E B E N S L A U F

Am 22. Juni 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Jorge Casals Huguet und seiner Frau Katharina geb. Stenzel in Madrid geboren. Daselbst besuchte ich die Deutsche Schule von Oktober 1949 bis September 1958. In dieser Zeitspanne bestand ich im Juni 1954 die Aufnahmeprüfung in die Oberschule. Nach durchlaufener Untertertia wurde ich in den 5. Kurs des "Bachillerato" des Madrider "Colegio de Nuestra Señora del Pilar" umgeschult. Im Juni 1960 bestand ich die Prüfung des "Bachillerato Superior" (Oberstufe) und im Juni 1961 das "Preuniversitario" an der Madrider Universität.

Im gleichen Jahr (1961) begann ich das Medizinstudium an der Universität Madrid, das ich im Juni 1967 zum Abschluß brachte.

Im Winter-Semester 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen zum Biochemiestudium.

Im Sommer-Semester 1968 begann ich meine Doktorarbeit im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen.